

Grundlagen und Anwendung autofluoreszenzbasierter Diagnoseverfahren in der Chirurgie des kolorektalen Karzinoms

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. K. Thomas Moesta

geboren am 6.3.1960 in Bonn

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 09.01.03
Datum der Habilitation: 12.2.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Hohenberger, Erlangen.....
2. Prof. Dr. R. Steiner, Ulm.....

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Methodik der zeitaufgelösten Fluorimetrie	16
4	Autofluoreszenz kolorektaler Primärtumoren und Metastasen	25
5	Biochemische Charakterisierung des einer tumorspezifischen Autofluoreszenzkomponente zugrunde liegenden Fluorophors	29
6	Fluorimetrische Charakterisierung des einer tumorspezifischen Autofluoreszenzkomponente zugrunde liegenden Fluorophors	34
7	Molekulare Ursachen der endogenen Akkumulation von Protoporphyrin IX im Tumorgewebe	40
8	Untersuchungen zur Tumor- und Metastasendetektion auf der Basis der endogenen Protoporphyrin IX-Akkumulation	53
9	Zusammenhang zwischen Tiefe einer Fluorophor-akkumulation im Gewebe und Signalintensität	76
10	Protoporphyrin IX-Autofluoreszenz als Prädiktions- und Responseparameter in der neoadjuvanten Therapie des Rektumkarzinoms	83
11	Zusammenfassung	101
12	Kooperation und Drittmittelförderung	105
13	Danksagungen	105
14	Literaturverzeichnis	108

1 Einleitung

Bei der Planung chirurgisch-onkologischer Resektionen kann der hohen interindividuellen Schwankungsbreite von Tumorerkrankungen nur insoweit Rechnung getragen werden, als sie einer zuverlässigen präoperativen Diagnostik zugänglich ist. So ist die Diversifizierung der Therapie des Rektumkarzinoms sicher wesentlich auf die Genauigkeit der rektalen Endosonografie im Hinblick auf die T-Kategorie der Primärtumoren zurückzuführen. Andere für Operations- und Therapieplanung wesentliche Faktoren, wie das Ausmaß einer lokoregionären lymphatischen Metastasierung, aber auch die Vitalität eines Primärtumors nach präoperativer multimodaler Therapie werden von bisherigen diagnostischen Verfahren nur unzureichend beschrieben. Ihre zuverlässige peri- oder intraoperative Diagnostik könnte durchaus eine weitergehende Präzisierung der chirurgischen Therapie ermöglichen. Kolon- und Rektumkarzinom sind exemplarisch für ein von empirischen Erkenntnissen über lymphonodale Ausbreitungswege abgeleitetes Standard-Resektionsausmaß. Da das initiale Ziel der hier vorgestellten Arbeiten darin bestand, ein intraoperatives, Fluoreszenz-basiertes Diagnoseverfahren für Lymphknotenmetastasen zu entwickeln, soll deren Bedeutung für die chirurgische Therapie hier zunächst im Detail dargestellt werden.

1.1 Lymphogene Metastasierung und Resektionsausmaß in der kolorektalen Tumorchirurgie

Die prognostische Bedeutung einer lymphogenen Metastasierung variiert in Abhängigkeit vom Organsystem. Bei Pankreaskarzinomen impliziert auch eine begrenzte lymphatische Metastasierung eine infauste Prognose [1, 2, 3]. Bei Vorliegen eines Mammakarzinoms wird jedwede lymphatische Metastasierung als Indiz für eine Generalisation der Erkrankung verstanden [4, 5]. Somit ist bei beiden Entitäten der Wert einer systematischen Lymphonodektomie zumindest unter therapeutischen Aspekten zweifelhaft. Demgegenüber wurde bei Patienten mit kolorektalem Karzinom Langzeitüberleben selbst bei metastatischem Befall der Grenzlymphknoten beobachtet [6, 7], die chirurgische Lymphonodektomie ist somit unbestrittener Bestandteil einer kurativ ausgerichteten Primärtherapie. Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist dennoch vom Befall der regionären Lymphknoten maßgeblich abhängig [8, 9, 10]. Die Fünfjahresüberlebensrate R0-resezierter Patienten in ausschließlich regionär lymphogen metastasiertem Stadium (Stadium III

nach UICC resp. Dukes C) beträgt je nach Untersuchung zwischen 50% und 70% [8, 10, 11].

1.1.1 Die Entwicklung der Lymphknotendisektion in der chirurgischen Behandlung des Rektumkarzinoms

Die ersten kolorektalen Resektionen wurden bereits im 18. Jahrhundert von *Faget* (1739) sowie im 19. Jahrhundert von *Lisfrank* (1826) und *Verneuil* (1873) berichtet. Die Chirurgie des Rektums wurde bei diesen Autoren allerdings über einen posterioren Zugang durchgeführt. *Czerny* war nach Angaben von *Miles* [12] der erste, der eine abdominoperineale Rektumexstirpation durchführte, allerdings aus einer intraoperativen Notwendigkeit und nicht aus Radikalitätsüberlegungen. Der Anfang des 20. Jahrhunderts dürfte dann als die Geburtsstunde des heutigen Verständnisses von onkologisch radikalen Resektionen am Rektum gesehen werden. *Miles* beschrieb 1908 die Methode der abdominoperinealen Rektumexstirpation, motiviert durch eine beobachtete Lokalrezidivrate von 94 % (54 von 57) nach Rektumresektionen über den posterioren Zugang. In seiner Arbeit beschrieb *Miles* drei Hauptzonen lymphatischer Tumorausbreitung für das Rektumkarzinom, deren Ausräumung er für die kurative Behandlung für erforderlich hielt, die „zone of downward spread“, in die er die perineale Haut, das ischiorektale Fett und die Sphinktermuskulatur einbezog, die „zone of lateral spread“, die das Lymphgewebe zwischen und um die Levator-Ani-Muskulatur, die Fascia pelvis und das Pelvisperitoneum einschloss, und die 3. „zone of upward spread“, die retrorektalen Lymphknoten oberhalb der peritonealen Umschlagfalte innerhalb des Mesorektum sowie die „paracholischen Drüsen“ und die Lymphknoten an der Bifurkation der linken Arteria iliaca comunis sowie die mittleren lumbalen Lymphknoten. Diese dritte Zone schien *Miles* die wichtigste. Er propagierte daher die en bloc-Resektion des Rektum mit den angegebenen Lymphknotenstationen. Diese Operation wurde für die nächsten Dekaden zum Standardeingriff für das Rektumkarzinom. Parallel publizierte *Clogg* [13] 1908 eine Serie von 72 Kolonkarzinomfällen und beschrieb eine enge Assoziation zwischen Lymphabflusswegen und arterieller Durchblutung. Er empfahl ein sich am arteriellen System des Kolons und an den lymphatischen Abflüssen orientierendes Resektionsausmass in Übereinstimmung mit den Postulaten *Halsted's* [14] für die Resektion des Mammakarzinoms sowie den Postulaten von *Moynihan* [15]. Für das Kolorektum stellte *Clogg* fest, dass „any operation for cancer is not nearly that of

removal of the primary growth but also its lymphatic drain as thoroughly as can be performed in accordance with the anatomy of the part". Auf diese Zeit geht auch bereits der Streit um die hohe Ligatur der Arteria mesenterica inferior zurück. Während Moynihan die Ligatur am Abgang der Aorta forderte, war Miles für den Erhalt des Gefäßstieles bis zum Abgang der Arteria colica sinistra. *Dickson* [16] inaugurierte Anfang der dreißiger Jahre das Prinzip der anterioren Resektion anfangs für Sigmakarzinome, später auch für Rektumkarzinome. *Dukes* erhob 1932 die lymphatische Metastasierung zu einem der wichtigsten Parameter seines seither gültigen Klassifikationssystems für Rektumkarzinome. In Kooperation mit *Dukes* untersuchte *Gabriel* bereits 1935 ganz detailliert auch die laterale lymphogene Ausbreitung von Rektumkarzinomen und berichtete bei einer Gesamtinzidenz von 62% nodal positiver Rektumkarzinome bei 100 Patienten über einen Befall der extrarektalen pelvinen Lymphknoten in 3,1 – 11 %. [17]. Im deutschsprachigen Raum legte *Westhues* mit seiner Monographie „*Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Chirurgie des Rektumkarzinoms*“ die Grundlage für eine ebenfalls am Lymphabfluss orientierte chirurgische Radikalität[18]. Bis Mitte der achtziger Jahre hat sich die Chirurgie des Rektumkarzinoms, abgesehen von der Einführung der no-touch-Technik durch *Turnbull* 1967 [19], nicht wesentlich verändert. Trotz der von Miles an sich klar beschriebenen lymphatischen Ausbreitungswege des Rektumkarzinoms betrugen bis zum Ende der achtziger Jahre die Lokalrezidivraten nach Rektumkarzinomchirurgie im Stadium Dukes B zwischen 10 und 25 % sowie im Stadium Dukes C zwischen 20 und 39 % [20, 21, 22, 23, 24, 25].

Vor dem Hintergrund dieser an sich inakzeptabel hohen Lokalrezidivraten gab es bereits frühzeitig Bestrebungen, die lokale sowie die Gesamtprognose des Rektumkarzinoms durch erweiterte Resektionsverfahren, insbesondere einer erweiterten Lymphonodektomie zu verbessern[26, 27, 28, 29]. Keine dieser Studien war randomisiert durchgeführt worden, keine hatte zu einem einschneidenden Wechsel des chirurgischen Vorgehens im angloamerikanischen oder europäischen Raum geführt. In Deutschland sind es vor allem die funktionellen und anatomischen Untersuchungen *Stelzners* [30, 31, 32, 33], die im Zusammenhang mit den von den *Heald und Mitarbeitern* mitgeteilten Resultaten der totalen mesorektalen Exzision [34, 35] zu einer Abkehr von der pelvinen, erweiterten Lymphonodektomie geführt haben. In Japan hat sich dieses Verfahren jedoch weiter entwickelt. Hier gab es Ende der achtziger und zu Beginn der neunziger Jahre eine Reihe von

vergleichenden Arbeiten zwischen erweiterter pelviner Lymphonodektomie und konventionell chirurgischem Vorgehen, die bei zwei von vier Arbeiten signifikante Vorteile für die radikale Lymphonodektomie zu belegen schienen [36, 37], in einer weiteren [38] einen zwar nicht signifikanten, aber deutlichen Trend zu einem besseren 5-Jahres-Überleben belegten und lediglich in einer Arbeit [39] auch keinen tendenziellen Vorteil sahen. Dem gegenüber stand aber eine hohe Rate von operationsspezifischen Nebenwirkungen im Sinne von Blasenentleerungsstörungen und Impotenz, die bei *Koyama* 1984 noch jeweils 100% betrugen [36], und bei *Hojo* 1989 immer noch 73% resp. 76% [37].

Dabei wurden in japanischen Arbeiten zu diesem Zeitpunkt ein Lymphknotenbefall außerhalb der mesorektalen Lymphknoten in bis zu 18 % der Patienten angegeben. In Anbetracht der hohen Morbidität einer lateral erweiterten Lymphdissektion schien es sinnvoll, ein individualisiertes Resektionsausmaß durch ein präzises lymphonodales Staging zu ermöglichen.

1.1.2 Lymphdissektion und Resektionsausmaß in der chirurgischen Therapie von Kolonkarzinomen

Für das Kolonkarzinom hat sich ebenfalls aus der Beobachtung einer alleinigen chirurgischen Kuration lymphogen metastasierter kolorektaler Karzinome ein heute in Deutschland in Leitlinienform festgelegtes Ausmaß der chirurgischen Radikalität sowohl hinsichtlich der Lymphdissektion als auch hinsichtlich der longitudinalen Ausdehnung am Hohlorgan etabliert (Informationszentrum für Standards in der Onkologie - ISTO 2002) [40]. Letztgenanntes Resektionsausmaß am Darm wird aber wiederum über die im Zuge der für notwendig erachteten Lymphdissektion resezierten Gefäßstämme definiert, sodass die lokalisationsabhängig definierte Empfehlung der Resektion von zum Teil mehr als 50% des Gesamtkolon ausschließlich auf einem postulierten Ausmaß lymphogener Metastasierung beruht. Tatsächlich sind aber ca. 60% der resezierten Kolonkarzinome zum Operationszeitpunkt nicht lymphogen metastasiert [41, 42]. Zumindest bei den Kolonkarzinomen spiegelt diese stadienunabhängige, imperative Festlegung somit im Wesentlichen den Mangel effektiver, vor allem sensitiver Untersuchungen für ein prä- oder intraoperatives Lymphknotenstaging wider. Wenngleich adäquate Untersuchungen zur Morbidität von Kolonresektionen in Abhängigkeit vom Resektionsausmaß fehlen, muss hier doch von einer Übertherapie bei bis zu 60%

der Patienten ausgegangen werden. Eine Erweiterung der Lymphdissektion bei Kolonkarzinomen zur Verbesserung der Prognose lymphatisch metastasierter Tumorstadien wird nur sehr vereinzelt diskutiert [43, 44]. Die bei leitliniengerechter Radikalität beobachtete geringe Lokalrezidivrate wird hier auch keine sinnvollen, prospektiven Studien ermöglichen.

Neben diesem rein mechanistischen Konzept der chirurgischen Entfernung lymphogener Tumormetastasen hat die Erkennung von Lymphknotenmetastasen unter dem Gesichtspunkt multimodaler onkologischer Behandlungskonzepte einen noch höheren Stellenwert. Die adjuvante Chemotherapie besitzt eine durch mehrere prospektive Studien abgesicherte unabhängige Wertigkeit beim kolorektalen Karzinom im UICC Stadium III [41, 45]. In nodal negativen Fällen ist die Indikation bislang nicht gesichert. Dennoch versterben auch im UICC Stadium II ca. 20% der Kolon- und 30% der Rektumkarzinom-Patienten an regionären und distanten Rezidiven [46, 47]. Mögliche Ursache hierfür ist neben einem primär ausschließlich hämatogenen Metastasierungsweg auch ein inadäquates Primärstaging durch die Pathologie. So konnte zunächst gezeigt werden, dass allein durch eine Erhöhung der Anzahl pathologisch untersuchter Lymphknoten der Anteil nodal positiver Kategorisierungen signifikant gesteigert wurde [42, 48]. Aufwändigere pathohistologische Techniken wie das Fettclearing, Serienschnittanalysen aller identifizierten Lymphknoten, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen führten alle im Vergleich mit einer konventionellen pathomorphologischen Aufarbeitung zu einer Erhöhung des Anteils nodal metastasierter Primärstadien [6, 49, 50, 51].

In einer Reihe von retrospektiven Untersuchungen konnte für einige dieser Verfahren auch die prognostische Relevanz der zusätzlich erkannten Lymphknotenmetastasen belegt werden [52, 53, 54]. Der generellen Einführung eines solchen ‚Lymphknoten-Superstaging‘ und damit auch seiner prospektiven, prognostischen Evaluation steht jedoch ein unökonomisch hoher Aufwand entgegen. Ein möglicher Ausweg wird im Rahmen des lymphogenen Metastasierungsstaging des Mammakarzinoms aufgezeigt. Hier wird die Sentinel node- Methode genutzt, um den oder die Lymphknoten mit dem jeweils höchsten Metastasierungsrisiko für eine aufwändigere, pathohistologische Untersuchung zu selektionieren. Für kolorektale Karzinome steht diese Technik am Anfang.

1.2 Intra- und perioperativen Lymphknotendetektion bei kolorektalen Karzinomen

1.2.1 Diagnostische Wertigkeit der chirurgischen Palpation

Als Gold-Standard der intraoperativen Lymphknotendiagnostik kann immer noch die Palpation durch den Chirurgen, gegebenenfalls unterstützt durch eine intraoperative Schnellschnittuntersuchung einzelner Lymphknoten gelten. Über die diagnostische Qualität dieses Verfahrens ist letztlich nicht viel bekannt. *Monig* berichtete 1999 übereinstimmend mit unseren Daten, dass Grösse und metastatischer Befall bei kolorektalen Lymphknoten nur sehr eingeschränkt korrelieren[55]. *Susuka* berichtet über die Sensitivität und Spezifität einer intraoperativen, auf Palpation durch erfahrene Chirurgen basierenden Lymphknotendiagnostik. Als Malignitätskriterium wurde ein Lymphknotendurchmesser über 5 mm und/oder eine derbe Konsistenz angenommen. Bei einem Gesamtuntersuchungsvolumen von 6431 pathologisch identifizierten Lymphknoten ergab sich eine Genauigkeit für die intraoperative Lymphknotendiagnostik von 56 %, eine Sensitivität von 93,2 % und eine Spezifität von 41,7 % [56].

1.2.2 Die ‚Radioimmunoguided Surgery‘ (RIGS)

Als konkurrierendes Verfahren zu fluoreszenzbasierten Systemen zur Ausbreitungsdiagnostik muss die so genannte „Radioimmunoguided Surgery“, kurz RIGS, gesehen werden. Dieses Verfahren geht letztlich auf erste Arbeiten von *Goldenberg et al.* 1978 zurück, der von *Köhler und Mielstein* entwickelte monoklonale CEA-Antikörper zur Radioimmunodetektion verschiedener menschlicher Karzinome einsetzte [57].

Das Konzept einer intraoperativen Tumorlokalisierung mit Hilfe einer handgeführten Gamma-Sonde zur Detektion von radioaktiv markiertem Anti-CEA, im Weiteren mit Radioimmunoguided Surgery (RIGS) bezeichnet, wurde 1984 erstbeschrieben [58]. Seitdem hat dieses Verfahren eine begrenzte Verbreitung gefunden. Aktuell wird der Einsatz vor allem in der second look-Chirurgie von kolorektalen Karzinompatienten aufgrund eines alleinigen CEA-Anstieges beschrieben. Hier beschreiben *Hadat* [59] und *Avital* [60] die Detektion von sieben Tumorrezidivlokalisationen bei 19 Patienten alleine durch die RIGS, wobei 24 weitere Rezidivlokalisationen durch die chirurgische Exploration gesichert worden waren. *Schneebaum* [61] berichtet über 124 RIGS-Untersuchungen im Rahmen von second-look-Operationen. Während er bei 38 %

der Patienten RIGS-positives Gewebe in der Periportalregion identifizieren konnte, wurden histologisch nur in 21 von den 44 Fällen Metastasen bestätigt, allerdings traten bei neun der Patienten mit histologisch negativem Befund im weiteren Verlauf an dieser Stelle Rezidivtumoren auf. Aus derselben Gruppe berichtet Cote 1995 [62] über eine Rate von 40 % durch Serienschnittanalysen und Immunhistochemie detektierte Mikrometastasen in RIGS-positiv, aber konventionell histologisch negativen Lymphknoten. Zusammenfassend scheint RIGS geeignet zu sein, okkulte Tumormanifestationen auch auf mikrometastatischem Niveau akkurat zu erkennen. Im Gegensatz zum Siegeszug der Sentinel Lymphonodektomie beim Mammakarzinom, die durchaus auch ein erhebliches technologisches Know How erfordert, hat sich die RIGS jedoch nicht breit etabliert. Die Gründe hierfür mögen in dem zumindest anfangs relativ langen notwendigen Intervall zwischen i.v.-Injektion und chirurgischer Exploration liegen, andererseits wurden Stabilitätsprobleme und Verfügbarkeitsprobleme des Radioimmun-Konjugates für diese Entwicklung verantwortlich gemacht..

1.2.3 Das Sentinel-node Konzept

Lymphabflussdarstellung und ‚Sentinel-Lymphknotenbiopsie‘ haben die Erkennung des Nodalstatus bei Brustkrebs- und Melanompatienten erleichtert und verbessert. Die Sentinel-Lymphknotenbiopsie erlaubt die Identifikation des Lymphknotens, der als erstes Filter im Lymphabflussweg eines bösartigen Tumors liegt und somit die höchste Wahrscheinlichkeit für einen metastatischen Befall aufweist [63, 64, 65]. Dieses erlaubt eine Fokussierung aufwändiger pathohistologischer Untersuchungsverfahren auf nur einen oder zumindest auf sehr wenige Lymphknoten [66, 67, 68]. Gegenwärtig wird das Sentinel-Lymphknotenverfahren für Brustkrebs und Melanom in die klinische Routine integriert [69, 70]. Ähnliche Ergebnisse können für das kolorektale Karzinom erwartet werden, wenngleich die Erfahrungen auf diesem Gebiet bislang ungleich geringer sind. Erste Studien haben die grundsätzliche Durchführbarkeit des Verfahrens belegt [71, 72, 73, 74]. Auch hier können die Lymphknoten mit der jeweils höchsten Wahrscheinlichkeit für einen metastatischen Befall identifiziert werden [72]. Neben dem Ziel einer Fokussierung und einer Präzisierung des Stagings kann die

Lymphabflussdarstellung grundsätzlich auch extraregionäre Ausbreitungswege aufzeichnen [75]. Insgesamt sind die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse bislang ausgesprochen präliminär und zum Teil widersprüchlich. Keine der zitierten Arbeiten hat sich gezielt mit der Situation am Rektumkarzinom befasst. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass die Detektion des ‚Sentinel‘-Lymphknotens allein noch keinerlei Aussage über dessen pathologischen Befall beinhaltet, sondern lediglich eine Vorselektion für die gezielte Exstirpation bzw. pathohistologische Aufarbeitung darstellt.

1.3 Laser-induzierte Fluoreszenzdiagnostik

Im biologischen Milieu sind nur wenige Moleküle in der Lage zu fluoreszieren, d.h. durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge aufgenommene Energie zum Teil durch Emission von Licht einer anderen, längeren Wellenlänge wieder abzugeben. Dieser Vorgang ist sowohl hinsichtlich der Anregungswellenlänge wie hinsichtlich der Emissionswellenlänge molekülspezifisch. Im biologischen Milieu kann man daher einzelne fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorophore, durch rein optische Methoden sensitiv und spezifisch nachweisen. Gelingt es, körpereigene oder exogen zugeführte Fluorophore zu identifizieren, die sich spezifisch in Tumorzellen anreichern, so könnte dies gerade im chirurgischen Umfeld zu einem geeigneten Werkzeug für eine Tumorausbreitungsdiagnostik führen.

1.3.1 Stand der Wissenschaft zur autofluoreszenzbasierten Tumordiagnostik

Eine Reihe von Autoren haben versucht, durch verschiedene fluorimetrische Techniken diagnostisch verwertbare, systematische Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgeweben zu identifizieren [76, 77, 78, 79, 80, 81]. Ein relativ konstant beobachtetes Phänomen ist die Reduktion einer im nahen ultraviolett oder im blauen Spektralbereich anregbaren Gewebeeigenfluoreszenz, insbesondere, wenn die Fluoreszenzmessungen von der luminalen Seite aus in Hohlorganen durchgeführt werden. Der erfolgreichste Ansatz dieser Technik hat in der Pulmonologie zur inzwischen weltweiten Einführung einer fluoreszenzunterstützten Bronchoskopie für die Erkennung von Dysplasien und Frühkarzinomen des Bronchialtraktes geführt [14, 82, 83, 84]. Bisherige Autofluoreszenzuntersuchungen waren jedoch im Wesentlichen auf die endoskopische Detektion früher epithelialer Veränderungen fokussiert, so daß der Schwerpunkt auf kurzweiliger Anregung und

Emissionsmessungen lag [78]. Untersuchungen zur Metastasierungsdiagnostik sind bislang nicht erfolgt.

1.3.2 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) intensivierte Autofluoreszenz:

Neben den Autofluoreszenz-basierten Systemen sind eine Vielzahl von Vorarbeiten zur fluoreszenzbasierten Tumordiagnostik nach exogener Zufuhr von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) auch hochrangig publiziert worden [85, 86, 87, 88]. Aufgrund der thematischen Nähe zu den hier vorgestellten Arbeiten soll hierzu eine kurze Einführung gegeben werden. 5-ALA ist ein natürlicher, relativ ungiftiger Vorläuferstoff in der Häm-Biosynthese (s. Abbildung 1.1 Enzyme und Substrate der Häm-Synthese) und fluoresziert selbst nicht. Aus einer exogenen Zufuhr von 5-ALA resultiert eine Akkumulation von Protoporphyrin IX (PpIX), mögliche Gründe hierfür werden in der Diskussion zu Kapitel 7 auf Seite 50 dargelegt). Diese Akkumulation ist aus bislang nicht eindeutig geklärten Gründen tumorspezifisch. PpIX kann fluorimetrisch detektiert werden. Bereits 2 bis 8 Stunden nach oraler oder intravenöser Gabe von 5-ALA wird in tierexperimentellen Untersuchungen und in klinischen Anwendungen ein Maximum der PPIX-Fluoreszenz erreicht. Nach 24 Stunden ist die Fluoreszenz praktisch nicht mehr nachweisbar.

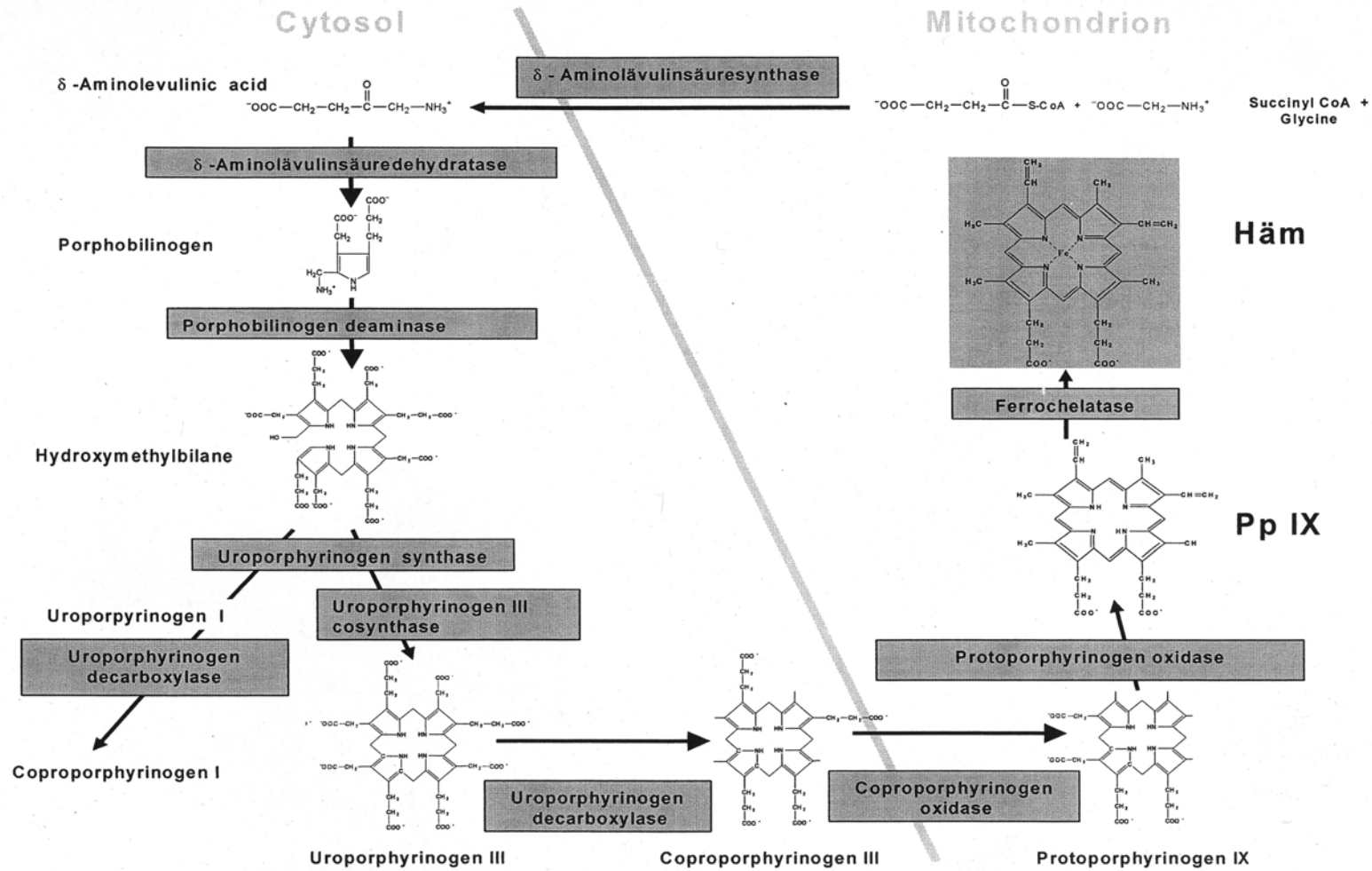


Abbildung 1.1 Enzyme und Substrate der Häm-Biosynthese

1.3.1 Bisherige klinische Ergebnisse 5-ALA basierter Fluoreszenzdiagnostik

Nach topischer 5-ALA-Applikation auf der Haut werden aus der Arbeitsgruppe um K. Svanberg [77, 89] mittels laserinduzierter Fluoreszenzmessung Kontraste zwischen Läsion und umgebender Haut von 9:1 (M. Bowen n=3) bis 15:1 (Basaliome, n=19, kutane B-Zell-Lymphome, n=5) beschrieben. Eine von derselben Arbeitsgruppe durchgeführte Kinetikstudie nach oraler Medikation belegte bereits nach 30 Minuten ein messbares Signal. Das Fluoreszenzmaximum trat nach 5-8 Stunden auf [90, 91].

Nach intravesikaler Instillation einer 3%igen 5-ALA-Lösung demonstrierten *Kriegmair et al.* [92] mit einem bildgebenden Detektionssystem eine Sensitivität von 96% bei einer Spezifität von 69%. Das Fluoreszenzverfahren war der Weißlicht-Zystoskopie deutlich überlegen (Sensitivität 73%, n=104 Pat., 35 Neoplasien ausschließlich durch Fluoreszenz erkannt). Diese Ergebnisse wurden zwischenzeitlich von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [93].

Messmann et al. [94] demonstrierten nach oraler Applikation von 5 -30 mg/Kg KG 5-ALA und einem Intervall zwischen Applikation und Diagnostik von 4-8 Stunden bei insgesamt 18 Patienten eine Korrelation zwischen ALA-induzierter Rotfluoreszenz und dem Vorliegen von Dysplasien in Biopsaten aus dem Ösophagus, Magen und Kolon bei Kolitis ulcerosa. Bei einem Patienten trat nach Sensibilisierung mit 30 mg/Kg KG 5-ALA ein transienter Transaminasenanstieg auf das 3-fache der Norm auf, ansonsten wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Die gemessene Erythemschwellendosis der Haut war für 24 Stunden erniedrigt, danach wieder normal.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Untersuchungen war es, zunächst die Autofluoreszenz kolorektaler Karzinome und ihrer Metastasen mit einer ‚state of the art‘ Fluoreszenzapparatur auf systematische Unterschiede zu relevanten Normalgeweben hin zu untersuchen.

Die Entdeckung eines weitgehend tumor- und metastasenspezifisch akkumulierenden Fluorophors führte dann zu den folgenden 3 Hauptfragestellungen:

2.1 Welches Fluorophor verursacht die tumorspezifische Fluoreszenz und warum akkumuliert es in Tumorzellen?

Aus der Betrachtung der Fluoreszenzspektren von Tumorgewebe, Tumormetastasen und Normalgewebe ergab sich die Hypothese eines tumorspezifisch akkumulierenden, einzelnen Fluorophors. Diese Hypothese war durch die biochemische Charakterisierung des Fluorophors sowie durch den Nachweis tumorzellmetabolischer Ursachen für dessen Akkumulation zu beweisen.

2.2 Kann die tumorspezifische Fluoreszenz für eine intraoperative, lymphonodale Ausbreitungsdiagnostik genutzt werden?

Aus chirurgischer Sicht ist eine intraoperative Ausbreitungsdiagnostik kolorektaler Karzinome im Hinblick auf die lymphonodale Metastasierung interessant. Dabei betrifft der klinische Aspekt beim Rektumkarzinom vorwiegend die Detektion einer lateralen lymphogenen Metastasierung, beim Kolonkarzinom ist eher ein intraoperativer Ausschluss einer lymphogenen Metastasierung im Hinblick auf eine Reduktion des Resektionsausmaßes am Organ von Interesse.

Darüber hinaus kann eine perioperative Vorselektion von Lymphknoten für eine intensivere pathohistologische Aufarbeitung im Sinne eines ‚Superstaging‘ Vorteile bringen.

Aus diesen klinischen Zielsetzungen ergibt sich die Frage nach diagnostischen Kenngrößen (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert) eines quantitativen fluorimetrischen Verfahrens.

2.3 Ist durch Messung der tumorspezifischen Fluoreszenz eine Beurteilung der Response von Rektumkarzinomen auf neoadjuvante Radiochemotherapie möglich?

Hier war zu prüfen, inwieweit die fluorimetrische Quantifizierung eines tumormetabolischen Produktes zur histopathologischen Tumorresponse korreliert

und somit diagnostische Basis für weitere Therapieentscheidungen (Resektionsausmaß, Fortführung oder Abbruch einer Zusatzbehandlung) sein kann.

Um den potentiellen klinischen Nutzen des Verfahrens einschätzen zu können, war es über die Beantwortung der Hauptfragestellungen hinaus erforderlich, folgende Nebenfragestellung zu bearbeiten:

2.4 Zusammenhang zwischen Tiefe einer Fluorophorakkumulation im Gewebe und Signalintensität

Die Beziehung zwischen der Tiefe einer in nicht spezifisch fluoreszierendem Gewebe eingebetteten Ansammlung eines speziellen Fluorophors und dem mess- und berechenbaren Fluoreszenzsignal ist sowohl für die Detektion metastatischer Absiedlungen in einer gewissen Gewebetiefe wie im Hinblick auf die Repräsentativität einer fluorimetrischen Messungen an voluminösen Primärtumoren von Interesse.

3 Methodik der zeitaufgelösten Fluorimetrie

3.1 Grundlagen der zeitaufgelösten Fluorimetrie

Bestimmte Moleküle sind in der Lage, Licht einer bestimmten Wellenlänge (Photonen einer bestimmten Energie) zu absorbieren und einen Teil dieser aufgenommenen Energie in Form eines emittierten Photons wieder abzugeben. Dieses emittierte Photon hat zwangsläufig eine niedrigere Energie als das absorbierte Photon, das emittierte Licht also eine längere Wellenlänge als das absorbierte Licht. Dieses Phänomen Fluoreszenz ist in drei Aspekten für das jeweilige Molekül, das Fluorophor, charakteristisch:

Die Anregungswellenlänge: nur solche Photonen können Fluoreszenz auslösen, deren Energiegehalt der Differenz zwischen zwei möglichen energetischen Zuständen des Moleküls entspricht. Ein Fluorophor kann durchaus mehrere solcher möglicher Anregungswellenlängen besitzen. Fluorophore können so durch ein Exzitationsspektrum charakterisiert werden (als Beispiel siehe Abbildung 6.3a).

Die Fluoreszenzemissionswellenlängen: Um nach Absorption eines Photons energetisch wieder in den Ausgangszustand zurückzukehren, emittieren fluorophore Photonen ebenfalls physikalisch definierter Energie. Diese Energien bzw. Wellenlängen sind ebenfalls charakteristisch für ein bestimmtes Fluorophor, können aber in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren (z.B. pH) leicht variieren. Fluorophore können daher durch ein Emissionsspektrum charakterisiert werden (als Beispiel siehe Abbildung 6.3 b).

Die Fluoreszenzlebensdauer: Die Emission eines Photons erfolgt mit abnehmender Wahrscheinlichkeit über einen endlichen Zeitraum nach der Absorption der Anregungsenergie. Dieser Prozess wird durch die Fluoreszenzhalbwertszeit charakterisiert. Die Fluoreszenzhalbwertszeit ist ebenfalls substanzspezifisch.

Fluorophore sind im biologischen Milieu selten. Auf der Suche nach Fluorophoren mit tumorspezifischer Anreicherung sollte eine Fluorimetrie-Apparatur alle drei substanzcharakteristischen Eigenschaften flexibel messen können. Anregungsseitig war daher ein durchstimmbares, gepulstes Lasersystem notwendig. Detektionsseitig war ein System zur spektralen Analyse mit einer zeitlich steuerbaren Intensivierung erforderlich. Die Intensivierung musste im Verhältnis zu den Anregungsimpulsen des Lasers so steuerbar sein, dass die Fluoreszenzabklingkinetiken messbar waren. Ein

solches System war in mehrjähriger Entwicklungsarbeit von der Arbeitsgruppe ‚Medizinische Messtechnik‘ der Physikalisch Technischen Bundesanstalt Berlin (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. H. Rinneberg) mit dem Ziel einer Fluoreszenzdetektion von langlebigen Fluorophoren in menschlichen Geweben entwickelt worden. Im Rahmen eines formellen Kooperationsvertrages zwischen PTB und Robert-Rössle-Klinik wurde diese Apparatur in der Robert-Rössle-Klinik installiert, und über alle hier beschriebenen Versuche von der PTB betrieben.

Das Prinzip der zeitverzögerten Fluoreszenzmessung wird in Abbildung 3.1 nochmals verdeutlicht. Die Fluoreszenz wird angeregt durch einen kurzen Laserimpuls im Absorptionsmaximum des Fluorophors. Diese Anregung führt zur Fluoreszenz, sowohl durch unspezifische Gewebefluorophore wie durch ein ggf. tumorspezifisches Fluorophor mit vergleichsweise langer Fluoreszenzlebensdauer. Im Beispiel 20 ns nach Fluoreszenzanregung ist die kurzlebige Fluoreszenz der unspezifischen Gewebefluorophore stark zurückgegangen, während die langlebigere Fluoreszenz des nachzuweisenden spezifischen Fluorophors persistiert. Durch Intensivierung der Detektionsapparatur (Optischer Multikanalanalysator in zwei Varianten) mit 20 ns Verzögerung zum Excitationspuls wird der Anteil der längerlebigen Fluoreszenzmission am Gesamtspektrum deutlich verstärkt.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden 2 unterschiedliche Varianten des Fluorimetrie-Messplatzes durch die Physikalisch-Technische Bundesanstalt realisiert. Gemeinsame Eigenschaften sind anregungsseitig die Generierung von kurzen Laserpulsen im Nanosekundenbereich in einer Konfiguration, die ein Durchstimmen der Laserquelle über alle Wellenlängen des sichtbaren elektromagnetischen Spektrums bis in das nahe Infrarot erlaubt. Die Repetitionsrate der Pulse lag bei der ersten Gerätekonfiguration bei 10 Hz, bei der zweiten Gerätekonfiguration bei 50 Hz. Detektorseitig wurde durch einen Polychromator und eine zeitlich in Abhängigkeit vom Anregungspuls schaltbare Intensivierung einer Diodenzeile, später einer CCD eine zeitaufgelöste Spektralanalyse ermöglicht.

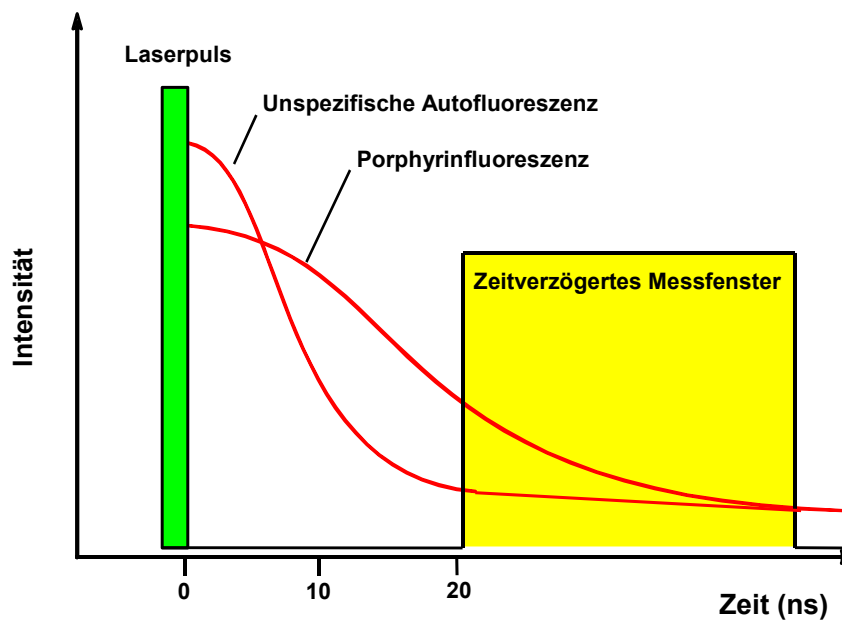


Abbildung 3.1 Prinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion. Mit einer Laserpulsanregung z. B. im grünen Spektralbereich werden unterschiedliche Fluorophore gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt. Dabei kann die Fluoreszenz unspezifischer Gewebsfluorophore durchaus überwiegen. Durch Fluoreszenzmessung mit zeitlicher Verzögerung gegenüber dem Anregungspuls lässt sich aber der Anteil längerlebiger Fluorophore am Gesamtspektrum verstärken.

Beide Versuchsaufbauten sind im Folgenden im Detail beschrieben.

3.2 Fluoreszenzapparatur 1

Die Gerätekonfiguration bestand aus einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser (GCR-10, Spectraphysics, Darmstadt) mit dessen dritter harmonischer Grundwelle (354 nm) ein optisch-parametrischer Oszillator gepumpt wird. Letzterer ist über nahezu den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts durchstimmbar und liefert Laserpulse von ca. 2 ns Länge und max. 10 mJ Pulsenergie bei einer Frequenz von 10/s. Fluoreszenzanregung und Detektion erfolgen über getrennte 400µm-Glasfasern. Die Fasern sind auf Eigenfluoreszenz getestet, die Spektren wurden für die Transmissionscharakteristik der Fasern korrigiert. Detektionsseitig ist ein optischer Multikanalanalysator durch einen Polychromator und eine intensivierte Diodenzeile realisiert. Die Intensivierung der Diodenzeile ist mit Bezug zum Laserpuls schaltbar (siehe Abbildung 3.2).

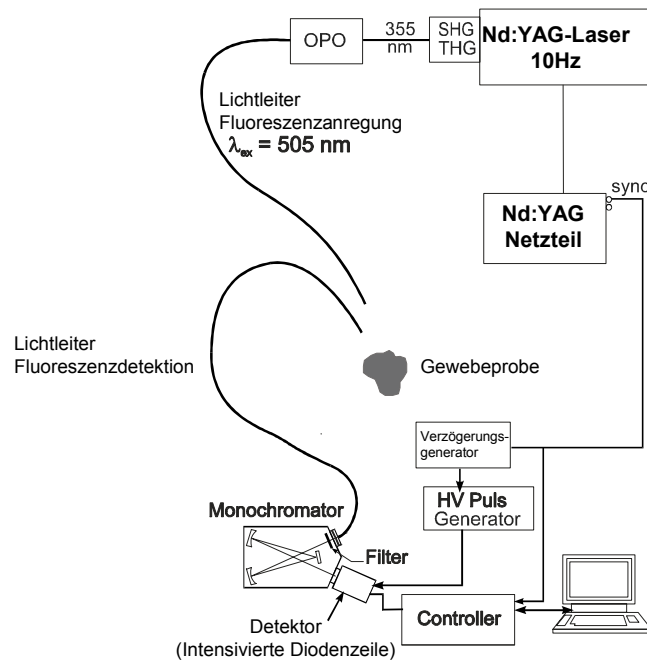


Abbildung 3.2: Fluoreszenzapparatur der ersten Generation. Ein gütegeschalteter Nd:YAG Laser pumpt mit einer Frequenz von 16 Hz den optisch-parametrischen Oszillator. Anregungs- und Detektionsfaser sind getrennt. Der Detektor besteht aus einem Polychromator und einer intensivierten Diodenzeile.

3.3 Fluoreszenzapparatur 2

Die zweite Generation der Fluoreszenzmessapparatur ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Ein gütegeschalteter (Q-switched) Nd:YAG Laser (50 Hz, incl. Seeder, Spectra-Physics, Darmstadt) pumpt mit der dritten Harmonischen ($\lambda=355$ nm) einen optisch-parametrischen Oszillator (OPO, GWU-Lasertechnik) mit einem β -BaB₂O₄ Kristall als nichtlinearem Medium. Diese Konfiguration ermöglicht die Abstimmbarkeit der Laserpulse zwischen 410 nm und ca. 700 nm (Signalwelle).

Nach Aufweitung des aus dem OPO austretenden Strahls in einem Teleskop, trifft dieser auf einen dichroitischen Spiegel, der das Fluoreszenzanregungslicht des Lasers ($\lambda=505$ nm) reflektiert und gleichzeitig als Langpaß für das emittierte Fluoreszenzlicht dient. Zur Anregung der Fluoreszenz des Gewebes wird die Laserstrahlung in einen 600 μ m Lichtleiter eingekoppelt, der gleichzeitig die Fluoreszenzstrahlung und Teile des reflektierten Lichtes zurückführt. Das längerwellige Fluoreszenzlicht passiert den Strahlteiler und einen zusätzlichen Langpassfilter $\lambda_{50\%} = 550$ nm und wird anschließend in eine zweite Faser

eingekoppelt, deren Austrittsseite wiederum auf den Spalt eines Imaging Polychromators abgebildet wird.

Der ‚*Imaging Polychromator SpektraPro-150*‘ der Fa. *Spectroscopy Instruments GmbH*, ermöglicht in Verbindung mit einer ICCD-Kamera, dem dazugehörigen Steuergerät und einem schnellen Rechner die Erfassung, Verarbeitung und Darstellung der Fluoreszenzspektren auf einem Monitor.

Den Öffnungspuls für die ICCD-Kamera zur Erfassung der prompten und zeitverzögerten Fluoreszenz liefert ein Hochspannungsgenerator der Fa. AvTech, der von einem Synchronisationspuls des Laser-Netzgerätes nach entsprechender Verzögerung mittels eines Delay-Generators, Fa. Stanford Research Systems, Inc. DG 535 angesteuert wird und gegenüber dem Laserpuls entsprechend verzögert werden kann.

Zur Verkürzung der Messzeit und zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurde der bisher eingesetzte Laser (GCR-11) der Fa. Spectra-Physics, der Laserpulse mit einer Wiederholrate von 10 Hz und relativ hohen Puls zu Puls-Schwankungen (30% nach dem OPO) nach umfangreichen Erprobungen in der PTB durch einen GCR-230 der Fa. Spectra-Physics ersetzt. Dieser Laser erzeugt Pulse mit einer Wiederholrate von 50 Hz und einer Pulsenergie von 160 mJ ($\lambda = 355$ nm), die durch den Einsatz eines Seeders deutlich geringere Schwankungen (< 10 % nach dem OPO) aufweisen.

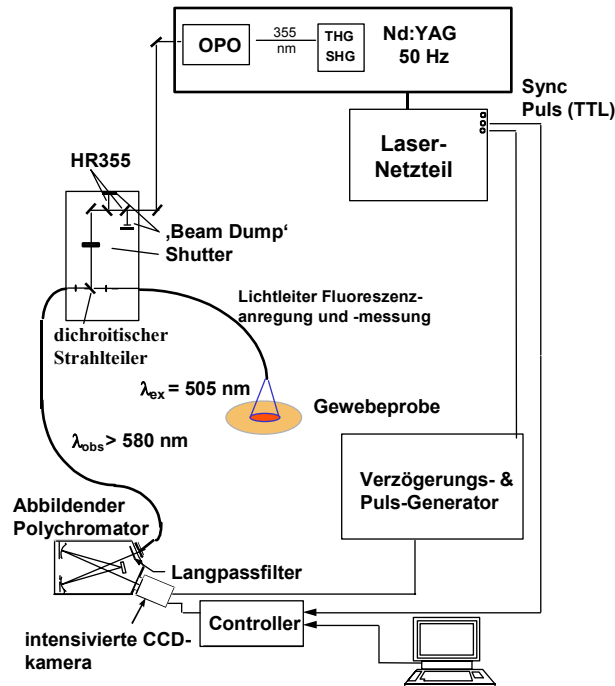


Abbildung 3.3: Fluoreszenzapparatur der zweiten Generation. Der gütegeschaltete Nd:YAG Laser pumpt mit einer Frequenz von 50 Hz den optisch-parametrischen Oszillator. Anregungslicht und Fluoreszenzdetektion sind über eine einzelne Faser möglich. Der Detektor besteht aus einer intensivierten CCD, die die gleichzeitige Registrierung mehrerer Spektren erlaubt.

3.4 Quantifizierung von Autofluoreszenzkomponenten mit langer Fluoreszenzabklingzeit

In den folgenden Kapiteln belegen fluorimetrisch das relativ tumorspezifische Vorkommen eines Fluorophors mit im Verhältnis zur breitbandigen Autofluoreszenz aller untersuchten Geweben relativ langer Fluoreszenzabklingzeit. Durch die zeitverzögerte Fluorimetrie lässt sich das Vorhandensein dieses Fluorophors auch in niedrigen Konzentrationen nachweisen. Ohne in jedem Fall die Identität des Fluorophors biochemisch überprüfen zu können, ziehen wir es vor, im Weiteren von *spezifischer Gewebeautofluoreszenz* zu sprechen. Diese ist durch Anregbarkeit bei $\lambda_{\text{ex}} = 505\text{nm}$, ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em}} \approx 630\text{ nm}$ und eine verhältnismäßig lange Fluoreszenzabklingzeit gekennzeichnet. Für alle weiteren Untersuchungen ist es erforderlich, diese spezifische Gewebeautofluoreszenz zu quantifizieren.

Die gemessenen Intensitäten der *spezifischen Gewebeautofluoreszenz* sind von der Oberflächenstruktur des biologischen Gewebes, der Konzentration von Blut (Absorption von Anregungslicht durch Hämoglobin) und von den geometrischen Verhältnissen abhängig. Es ist daher nicht möglich, gemessene absolute Fluoreszenzintensitäten selbst in ein und demselben Patienten zu vergleichen. Daher

waren quantitative fluorimetrische Maßzahlen heranzuziehen, die situationsadaptiert reproduzierbare und intra- wie interindividuell vergleichbare Parameter für die *spezifische Gewebeautofluoreszenz* lieferten. Die Quantifizierung erfolgt hier durch Bildung einer Relation zur unspezifischen, breitbandigen Gewebeautofluoreszenz, für die eine Vielzahl verschiedener Fluorophore verantwortlich sind. Diese Parameter sind damit weitgehend unabhängig von den geometrischen Messbedingungen und von der eingestrahlten Energie des die Fluoreszenz anregenden Lichtes. Sie sind aber naturgemäß nicht unabhängig von Absorptions- und Streueigenschaften des Gewebes für Licht, sodass nur eine begrenzte Korrelation zur Gewebekonzentration des PpIX bestehen kann.

3.4.1 Die normierte spezifische Fluoreszenzintensität

Fluoreszenzemissionsspektren sind nur qualitativ, nicht quantitativ interpretierbar, da die gemessene absolute Lichtintensität von vielen Faktoren (Geometrie von Quelle und Detektor, Winkel und Abstand zur Probe, Anregungsenergie etc.) abhängt. Die Spektren werden daher grundsätzlich *normiert*, d.h. die jeweils höchste gemessene Intensität wird gleich 1 gesetzt.

Zum Zwecke des spektralen Vergleichs verfolgen wir hier die Isolierung der substanzspezifischen Fluoreszenzanteile. Hierfür betrachten wir das normierte Fluoreszenzspektrum $I_n(\lambda, t_d)$ als die Summe der normierten spezifischen Gewebeeigenfluoreszenz $I_n^{sp}(\lambda, t_d)$ und des unspezifischen Autofluoreszenzhintergrundes $I_n^{nsp}(\lambda, t_d)$.

$$I_n(\lambda, t_d) = I_n^{sp}(\lambda, t_d) + I_n^{nsp}(\lambda, t_d) \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Um für den unspezifischen Autofluoreszenzhintergrund im verzögert registrierten Spektrum ($t_d = 20$ ns) zu korrigieren, nehmen wir an, dass (i) das unverzögert registrierte normierte Fluoreszenzspektrum $I_n(\lambda, 0$ ns) durch den unspezifischen Autofluoreszenzhintergrund dominiert ist und dass (ii) die Abklingrate der unspezifischen Gewebeautofluoreszenz unabhängig von der Emissionswellenlänge ist. Hieraus folgt, dass der unspezifische Autofluoreszenzhintergrund im verzögert registrierten Spektrum ($t_d = 20$ ns) wie folgt beschrieben werden kann:

$$I_n^{\text{nsf}}(\lambda, 20 \text{ ns}) = \frac{I(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 0 \text{ ns})} I_n(\lambda, 0 \text{ ns}) \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Der erste Term auf der rechten Seite der Gleichung 3.2 beschreibt die Abklingrate der unspezifischen Gewebeeigenfluoreszenz, ermittelt bei $\lambda = 595 \text{ nm}$. Diese Wellenlänge liegt außerhalb sowohl der Fluoreszenzbanden der spezifischen Gewebeautofluoreszenz als auch außerhalb des Absorptionsmaximums des Hämoglobins ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Aus Gleichung 3.1 und Gleichung 3.2 lässt sich ableiten, dass die Intensität der spezifischen Gewebeautofluoreszenz bei zeitverzögerter Messung ($t_d = 20 \text{ ns}$) beschrieben werden kann als

$$I_n^{\text{sp}}(\lambda, 20 \text{ ns}) = I_n(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns}) \left\{ \frac{I(\lambda, 20 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns})} - \frac{I(\lambda, 0 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 0 \text{ ns})} \right\} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Die oben genannten Annahmen treffen zu, wenn die spezifischen Gewebeeigenfluoreszenzanteile im unverzögert registrierten Spektrum klein sind im Vergleich zum unspezifischen Autofluoreszenzhintergrund, mögen aber fraglich sein, wenn hohe Peaks der spezifischen Gewebeautofluoreszenz, z.B. in Tumorgewebe auftauchen. Auf der anderen Seite ist in diesem Fall der Anteil der unspezifischen Gewebeautofluoreszenz im verzögert registrierten Spektrum so gering, dass Gleichung 3.3 sich darstellt als $I_n^{\text{sp}}(\lambda, 20 \text{ ns}) \approx I_n(\lambda, 20 \text{ ns})$.

Die normierte spezifische Fluoreszenzintensität I kann demnach ausgedrückt werden als:

$$I = I_n^{\text{sp}}(630 \text{ nm}, 20 \text{ ns}) \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Die Berechnung erfolgt entsprechend Gleichung 3.3:

$$I_n^{\text{sp}}(630 \text{ nm}, 20 \text{ ns}) = I_n(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns}) \left\{ \frac{I(630 \text{ nm}, 20 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns})} - \frac{I(630 \text{ nm}, 0 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 0 \text{ ns})} \right\} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Es ist unschwer erkennbar, dass diese Form der Quantifizierung relativ aufwendig ist.

3.4.2 Quantitative spezifische Fluoreszenzintensität R

Neben der normierten spezifischen Fluoreszenzintensität I , bestimmt im Maximum der Hauptbande des spezifischen Fluorophors, kann eine einfachere Verhältnisbildung

$$R = \frac{I(630 \text{ nm}, 20 \text{ ns})}{I(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns})} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

durchaus zur Quantifizierung der spezifischen Fluoreszenz genutzt werden. Beide Parameter sind stark korreliert (Abbildung 3.4) [95] und führen im Wesentlichen zu den selben Ergebnissen.

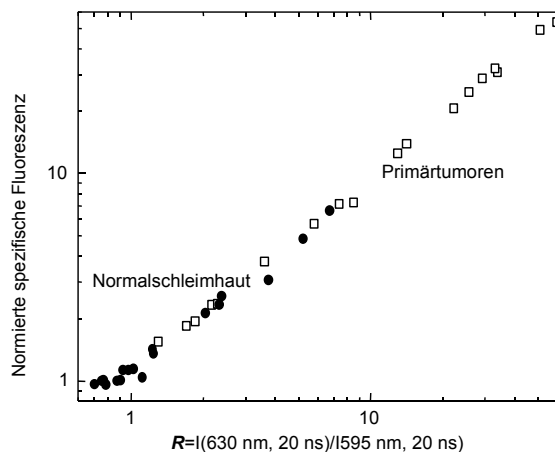


Abbildung 3.4 Korrelation von normierter spezifischer Fluoreszenz I mit spezifischer Fluoreszenz R für kolorektale Primärtumoren und Normalschleimhautmessungen

Das ist nicht weiter überraschend, da das Verhältnis $I(630 \text{ nm}, 20 \text{ ns}) / I(595 \text{ nm}, 20 \text{ ns})$ innerhalb der Klammer in Gleichung 3.5 erscheint. Daher werden im Folgenden immer dort, wo ein einzelner quantitativer Parameter zur Beschreibung der spezifischen Fluoreszenzintensität erforderlich ist, R -Werte entsprechend Gleichung 3.6, angegeben. Nur in besonderen Fällen wird die Fluoreszenz als normierte spezifische Autofluoreszenz $I_n^{sp}(633 \text{ nm}, 20 \text{ ns})$ als quantitativer Parameter verwendet.

4 Autofluoreszenz kolorektaler Primärtumoren und Metastasen

4.1 Ziele

In einer Initialphase wurde das Ziel verfolgt, die Autofluoreszenz gastrointestinaler Karzinome mit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmesstechnik zu analysieren und auf das Vorhandensein systematischer Unterschiede zwischen Primärtumor, Metastase und relevanten Normalgeweben hin zu untersuchen.

4.2 Methodik

Zu diesem Zweck wurden Proben von Tumor- und Normalgewebe, darunter auch von regionären, tumorfreien und tumorbefallenen Lymphknoten in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt fluorimetrisch vermessen. Der messtechnische Aufbau entsprach der im Kapitel 3.2 dargestellten 1. Variante. Die Proben entstammten Resektionspräparaten von kolorektalen Primärtumoren, wurden in der Robert-Rössle-Klinik zugeschnitten und in Messkapseln zwischen planparallelen Quarzglasscheiben mit einem Abstand von 2 mm positioniert und so in die Physikalisch-Technische Bundesanstalt transportiert. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Zeitintervall zwischen Entnahme des Gewebes und Fluoreszenzmessung mehrere Stunden.

4.3 Ergebnisse

Neben der ubiquitären, insbesondere im blauen und grünen Spektralbereich unspezifisch anregbaren und bis in den roten Spektralbereich unspezifisch emittierten Gewebeeigenfluoreszenz mit kurzer Fluoreszenzhalbwertszeit detektierten wir in den Primärtumoren bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 505$ nm eine langlebige Fluoreszenzkomponente mit zwei Emissionsbanden bei $\lambda_{\text{em1}} = 630$ nm und bei $\lambda_{\text{em2}} = 700$ nm. In den untersuchten Primärtumoren waren diese Banden bereits im unverzögerten Spektrum deutlich zu erkennen. Ihre relative Intensität nahm mit zunehmender Verzögerung der Fluoreszenzmessung zu und war bei einer Verzögerungszeit von 20 Nanosekunden im Spektrum absolut dominant (Abbildung 4.1 a) und b)) Diese Fluoreszenzkomponente war über den Proben der Normalschleimhaut im unverzögerten Spektrum im Regelfall nicht nachweisbar (Abbildung 4.1c) und d)).

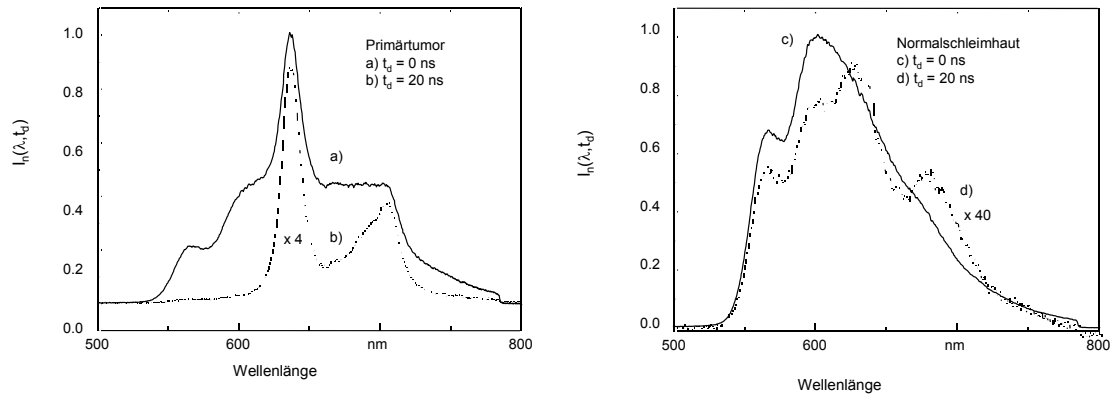


Abbildung 4.1 Fluoreszenzspektren kolorektaler Normalschleimhaut (c. und d.) und eines Primärtumors (a. und b.). Dargestellt sind unverzögert registrierte Spektren (a. und c.) sowie Spektren, die mit einer Zeitverzögerung von ($\Delta t = 20$ ns) aufgenommen wurden (b. und d.). Die Spektren a) und b) weisen bei 630 nm und um 700 nm zwei spezifische Banden auf, dabei entspricht Spektrum b) praktisch einem reinen Porphyrinspektrum. In der Normalschleimhaut sind diese Banden ausschließlich im zeitverzögert gemessenen Spektrum und dort auch nur andeutungsweise zu erkennen. Diese Spektren repräsentieren typische, keineswegs maximale Ergebnisse.

Nach 20 Nanosekunden Zeitverzögerung war die relative Intensität der gemessenen Spektren über der Normalschleimhaut um einen Faktor 40 abgefallen (Abfall der Fluoreszenzintensität der 630 nm-Bande über dem Primärtumor im gleichen Zeitraum nur Faktor 4). Bei entsprechender Skalierung der verzögerten Spektren ließen sich die beiden Banden 630 nm und 700 nm jedoch auch in der Normalschleimhaut andeutungsweise erkennen. Die unverzögert registrierten Spektren bei $\lambda_x = 505$ nm zeigten zunächst keine Unterschiede zwischen metastatisch befallenen und normalen Lymphknoten (Abbildung 4.2). Bei spektralen Messungen mit einer Zeitverzögerung von 20 Nanosekunden zeigten sich jedoch die oben beschriebenen Fluoreszenzbanden bei 630 und 700 nm über metastatisch befallenen Lymphknoten zum Teil sehr deutlich, während sie über nicht metastatisch befallenen Lymphknoten nicht oder zumindest wesentlich schwächer zu erkennen waren.

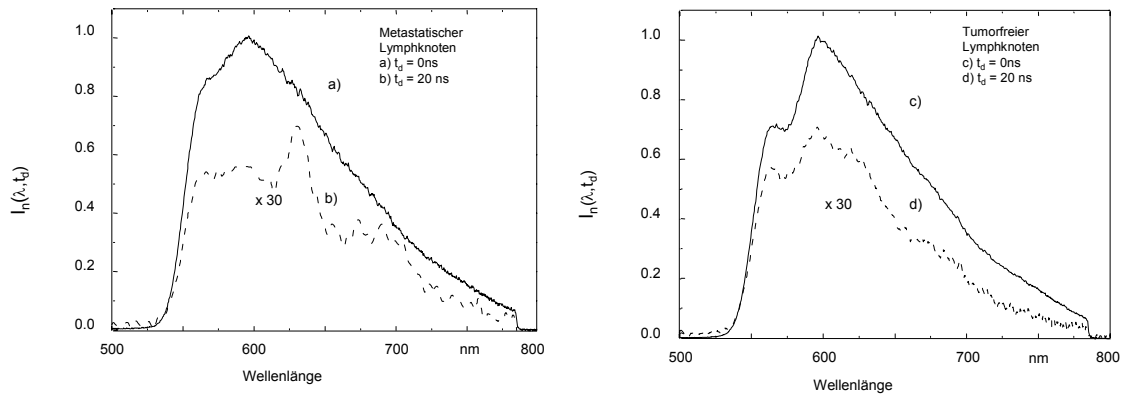


Abbildung 4.2 Fluoreszenzspektren tumorfreier (c. und d.) und metastatisch befallener (a. und b.) kolorektaler Lymphknoten. Dargestellt sind unverzögert registrierte Spektren (a. und c.) sowie Spektren, die mit einer Zeitverzögerung von ($\Delta t = 20$ ns) aufgenommen wurden (b. und d.). Spektrum b) weist bei 630 nm und um 700 nm zwei spezifische Banden auf, die in Spektrum d) nur angedeutet sind. Diese Spektren repräsentieren typische, keineswegs maximale Ergebnisse.

4.4 Diskussion

Das Vorhandensein einer mit Schwarzlicht anregbaren, lachsroten Fluoreszenz in bestimmten Tumoren wurde bereits 1924 von *Policard* in seiner Arbeit „Études sur les aspects offertes par les tumeurs experimentale examinées à la lumière de Wood“ beschrieben [96]. Bereits wesentlich später, 1960, beschrieben *Ghadially und Neish* in *Nature* die porphyrintypische Fluoreszenz experimentell induzierter Plattenepithellymphknotenarzinome [97]. Ghadially musste aber kurze Zeit später einräumen, dass sein Fluoreszenzsignal offenbar durch tumorkolonisierende Bakterien hervorgerufen wurde, denn die Fluoreszenz war abwischbar. Dieses Phänomen einer bakteriell induzierten Porphyrinfluoreszenz wurde von *Harris* 1987 nochmals aufgegriffen und unter dem Aspekt der hämatoporphyrinderivat-induzierten Fluoreszenzdiagnostik als möglich Ursache von falsch positiven Ergebnissen diskutiert. [98]. Daneben haben eine ganze Reihe anderer Arbeitsgruppen versucht, invasive Karzinome und Dysplasien aufgrund von Autofluoreszenzeigenschaften zu detektieren. Am erfolgreichsten in dieser Hinsicht ist die Arbeitsgruppe von *Lam* in Vancouver. Seine Arbeitsgruppe beschrieb zu Beginn der neunziger Jahre signifikant *verminderte* Autofluoreszenzintensitäten bei frühen Bronchiallymphknotenarzinomen und Dysplasien. In der initialen Charakterisierung verwandten sie Anregungswellenlängen von 405 nm, 442 nm sowie 488 nm und beobachteten eine im Grunde dem Normalgewebe gleichende, jedoch in der Intensität wesentlich geringere Autofluoreszenz über Tumorgewebe. Diese Ergebnisse führten in der Zwischenzeit zur Entwicklung des als LIFE-System bekannten

autofluoreszenzbasierten bronchoskopischen Detektionssystems für Bronchiallymphknotenarzinome, das inzwischen eine relevante klinische Verbreitung gefunden hat [82] [18, 83, 84].

Andere Arbeitsgruppen machten ähnliche Beobachtungen auch bei gastrointestinalem Tumorgewebe [99]. [81, 100, 101] All diesen Untersuchungen ist gemein, dass ihre Anregungswellenlängen zwischen 400 und 512 nm liegen, das spektroskopische Augenmerk aber weniger auf den Spektralbereich zwischen 600 und 700 nm gerichtet war. Keine der Studien mit Ausnahme der Arbeit von *Cothren* verwandte eine zeitaufgelöste Fluorimetrieapparatur. *Cothren* verwandte seine zeitaufgelöst arbeitende Apparatur nicht zur zeitverzögerten Spektralanalyse, sondern lediglich, um das störende Weißlicht des Endoskopes ausblenden zu können [99]. In einer 1995 erschienenen Analyse widmet sich *Bottiroli* differenziert der Autofluoreszenz von kolorektalen Normalgeweben und Karzinomen. Auch hier liegt der Schwerpunkt der Betrachtung in der anregungsnahen Autofluoreszenzintensität, deren Reduktion auf die Zerstörung der Submucosa zurückgeführt wird [78]. Die Ursachen für die Autofluoreszenzreduktion im Gewebe sind relativ unbekannt. *Papazoglou* spekuliert, dass der Autofluoreszenzreduktion im Tumor im wesentlichen relative Konzentrationsunterschiede oxydierter und reduzierter Flavine zugrunde lägen [76] und beruft sich dabei auf eine 1942 erschienene Arbeit über Vitaminkonzentrationen in kanzerösen Geweben [102]. Darüber hinaus existieren eine ganze Reihe weiterer Gewebeschromophore (s. Tabelle 4.1), die in Tumorgeweben durchaus unterschiedlich gegenüber den Normalgeweben verteilt sein können. Für Elastin ist eine solche Reduktion der elastinbedingten Fluoreszenz in Melanomgeweben mit einer Erhöhung der Elastindichte in unmittelbarer Tumorperipherie ganz konkret beschrieben [103].

Vor dem Hintergrund dieses Wissens über die Autofluoreszenz maligner Tumoren war unsere Beobachtung eines porphyrintypischen Signals auch in Lymphknotenmetastasen kolorektaler Karzinome zumindest neu. An anderer Stelle werden wir darüber hinaus Argumente gegen zumindest eine ausschließliche bakterielle Genese der beobachteten hohen porphyrintypischen Fluoreszenzen in kolorektalen Primärtumorgeweben finden. Diese Entdeckung führte uns im Weiteren zu Untersuchungen, die zum einen die Natur des Fluorophors weiter klären, zum anderen seine diagnostische Verwertbarkeit überprüfen sollten.

Tabelle 4.1 Biologisch relevante Fluorophore und ihre Excitations- (λ_{ex}) und Emissionsmaxima (λ_{em}), nach [76]

Fluorophor	Gemessen in	Maxima [nm]	
		λ_{ex}	λ_{em}
Tryptophan	Lösung	275	350
NADH	Lösung	350	460
NADPH	Lösung	350	460
4-Pyridoxalsäure	Lösung	300	435
Pyridoxal 5'-Phosphat	Lösung	305	375
Kollagen I	Pulver	410	520
		340	395
		270	395
Kollagen III	Pulver	285	310
		275	310
		330	390
Elastin	Pulver	370	450
		460	520
		360	410
		425	490
		260	410

5 Biochemische Charakterisierung des einer tumorspezifischen Autofluoreszenzkomponente zugrunde liegenden Fluorophors

5.1 Einführung

Die lachsrote Eigenfluoreszenz einzelner Karzinomtypen ist seit der Veröffentlichung Policard's von 1924 bekannt [96]. Einige Autoren haben sie in der jüngeren Vergangenheit erneut beschrieben, ohne jedoch die Natur des Fluorophors biochemisch aufzuklären [97] [98]. Seit den Arbeiten von Ghadially 1962 wurde eine bakterielle Genese der Porphyrinfluoreszenz angenommen. Nachdem wir mit einer wesentlich sensitiveren Apparatur vergleichbare Fluoreszenzspektren nicht nur in kolorektalen Primärtumoren, sondern auch in Tumormetastasen in regionären Lymphknoten, aber auch in der Leber und in einem Einzelfall selbst in einer Peritonellymphknotenkarzinose nachweisen konnten (s. auch Kapitel 8 sowie *Ebert et al.* [95]) war ein tumorintrinsic Akkumulationsmechanismus wahrscheinlicher. Um diesen weiter zu klären war zunächst die Identifizierung des Fluorophors notwendig.

5.2 Material und Methoden

Die Messungen erfolgten zum Teil bei den in Kapitel 12.1 genannten Kooperationspartnern in Marburg (Abteilung Klinische Chemie der Universität, Leiter Prof. Dr. M. O. Doss, dünnschichtchromatografischer Ansatz) und in Buffalo, USA (Department of Radiation Biology am Roswell Park Cancer Center, Leitung: Prof. Dr. T.J. Dougerthy, flüssigkeitschromatografischer Ansatz)

5.2.1 Dünnschichtchromatografischer Ansatz

5.2.1.1 Patienten

Nach initialer Etablierung der Methodik wurden Gewebeproben von 6 Patienten (Primärtumoren und unmittelbar benachbarte kolorektale Schleimhaut nach ex-vivo-Fluoreszenzuntersuchungen bei -80° Celsius eingefroren.

5.2.1.2 Gewebeaufbereitung:

Normal- und Tumorgewebe wurde mit in PBS (3 ml pro g Frischgewicht) gepottert. Das gepotterte Extrakt wurde in Reagenzgläsern eingefroren, gefriergetrocknet und anschließend mit Methanol-Schwefelsäure (95:5, v/v) über Nacht verestert.

5.2.1.3 Porphyrinextraktion:

Die entstandenen Porphyrinmethylester wurden nach Zugabe von ca. 5 ml aqua dest. so lange mit Chloroform extrahiert, bis der Überstand klar war und nicht mehr fluoreszierte. Die Überstände wurden in ein zweites Reagenzglas überführt, mit Natriumcarbonatlösung (50 g/l) neutralisiert und mit Wasser geschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die obere Phase abgezogen und verworfen, die Chloroformphase zweimal mit Wasser gespült. Die wässrige Phase wurde jeweils abgezogen und verworfen, die Chloroformphase sodann mit Na₂SO₄ getrocknet. Es wurde so lange mit Chloroform gespült, bis die Chloroformphase wieder klar war und nicht mehr fluoreszierte. Das Chloroform wurde jeweils über einen Filter in ein Spitzkölbchen überführt und bis zur Trocknen eingedampft, der Rückstand mit wenigen Tropfen Chloroform gelöst und auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

5.2.1.4 Dünnschichtchromatographie:

Die Trennung der Porphyrinmethylester erfolgte in einer Desaga-Chromatographie-Kammer. Die Dünnschichtplatten wurden in Benzol-Ethylacetat-Methanol System entwickelt:

- 100 ml des Lösungsmittels wurden in eine Chromatographiekammer gegeben.
- Chromatographie bis zu einer Laufhöhe von 2 cm in Chloroform-Methanol (130:20, v/v). Das Chromatogramm wurde entweder 40 Minuten bei Raumtemperatur oder 12 Minuten mit Hilfe eines Kaltluftföns im Dunkeln getrocknet.
- Chromatographie in Petrolether (40-60 °C)-Diethylether (2:1,v/v) bis zum oberen Ende der Platte.
- Chromatographie in Benzol-Ethylacetat-Methanol (85:13,5:1,5, v/v/v) bis zu einer Laufhöhe von 8 - 14 cm.

Standards von Uro-, Kopro- und Protoporphyrin wurden cochromatographiert.

5.2.1.5 *Elution der Porphyrinester:*

Die Platten wurden getrocknet und im langwelligen UV-Licht als rot-fluoreszierende Banden markiert. Das bandenhaltige Silikagel wurde mit einem Skalpell ausgekratzt, in ein Spitzröhrchen überführt und in 1 ml Chloroform gelöst.

5.2.1.6 *Spektrophotometrische Quantifizierung der Porphyrinester:*

Der Überstand aus dem Spitzröhrchen wurde in eine Küvette überführt und spektrophotometrisch von 650-380 nm vermessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte anhand des millimolaren Extinktionskoeffizienten.

5.2.1.7 *Trockengewichtsbestimmung:*

Etwa 200-400 mg Frischgewicht des Gewebes wurde in Reagenzgläsern mit Stopfen bei -20 °C eingefroren. Das Trockengewicht des Gewebes wurde mit einer Analysenwaage bestimmt, nachdem es im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden war.

5.2.2 Flüssigkeitschromatografischer Ansatz

Der Ansatz folgt einer Methodenbeschreibung von Bellnier et al. 1997 [104].

Reagenzien. SolvableTM von Packard Instruments Co. (Meriden, CT, USA) enthielt 3% N,N-dimethyl-Laurylaminoxid, 3% ALymphknotenxyloxyethanol und 2% Natriumhydroxyd in Wasser. Protoporphyrin IX (PpIX) wurde von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Uroporphyrin III dihydrochlorid und

Coproporphyrine III dihydrochlorid wurden von Porphyrin Products (Logan, UT, USA) in der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheit bezogen.

Gewebevorbereitung: 25-50 mg des Gewebes wurden mit 1 ml Solvable™ überdeckt und für 12 h bei Dunkelheit und 50°C extrahiert. Die resultierende Lösung wurde microfiltriert (45 µm) und die klaren, leicht gefärbten Filtrate bei Raumtemperatur in Dunkelheit aufbewahrt.

HPLC-Analyse. Die HPLC Analyse wurde mittels eines Spectra Physics solvent delivery system (Mod. SP8700, San Jose, CA, USA) und eines Spectraflow 757 absorbance detector (Kratos Analytical Instruments, Ramsey, NJ, USA) durchgeführt. Als Säule kam eine LiChrospher 100RP-8 (4 mm x 250 mm; 5 µm Partikelgröße, Merck, Darmstadt) zur Anwendung. Porphyrine wurden nach folgendem Schema ausgewaschen: 100% Lösungsmittel A (60% Methanol, 40% 10mM Na-Phosphatpuffer, pH 7.5) für 10 min, gefolgt von einem linearen Gradienten auf Lösungsmittel B (90% Methanol, 10% 2mM Na-Phosphatpuffer, pH 7.5) über die folgenden 30 Minuten. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min; Das Injektionsvolumen 20µl. Die in Solvable™ gelösten Proben wurden vor der Analyse mit 1N HCl auf einen pH von 7.5 eingestellt. Standardlösungen wurden mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Lösungen von PpIX, Uroporphyrin III Dihydrochlorid und Coproporphyrin III Dihydrochlorid hergestellt.

5.2.3 Fluoreszenzanalyse der Fraktionen nach biochemischem Trennverfahren

Zeitverzögerte Fluoreszenzemissionsspektren sowohl von den gereinigten Porphyrinfraktionen wie den Uro- Kopro- und Protoporphyrin-Standards aufgenommen und mit den ursprünglichen Gewebespektren verglichen.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Dünnschichtchromatografischer Ansatz

Bei einer Tumorprobe wurde Koproporphyrin nachgewiesen. In allen Tumorproben und in 4/6 Normalgewebeproben wurde Protoporphyrin IX in einem

Pat. Nr.	Gewebetyp	Koproporphyrin [pmol / g Trockengewicht]	Protoporphyrin [pmol / g Trockengewicht]
7	Tumor	--	341
	Normal	--	--
8	Tumor	--	616
	Normal	--	341
9	Tumor	--	505

	Normal	--	--
10	Tumor	--	229
	Normal	--	337
11	Tumor	--	593
	Normal	--	226
N.A.*	Tumor	305 pmol	1493
	Normal	--	469

Tabelle 5.1 Koproporphyrin- und Protoporphyrin-Konzentrationen in kolorektalen Primärtumoren und umgebender Normalschleimhaut pro g Trockengewicht. (* Gewebeproben eines Patienten außerhalb der Studie)

Konzentrationsbereich von 226 bis 1493 pmol/g Trockengewicht nachgewiesen (Tabelle 5.1). In allen Tumorproben, ausgenommen Patient #10, ist die Stoffmenge an PpIX höher als im Normalgewebe

5.3.2 Ergebnisse Flüssigkeitschromatografie

Die Analyse von Gewebeproben aus der Gewebekbank der Robert-Rössle-Klinik durch reverse Phase HPLC zeigte mit hoher Konstanz einen früh ausgewaschenen breiten Peak bei 2 min, der durch Addition von Uroporphyrin III- oder Koproporphyrin III-Standardlösungen akzentuiert werden konnte. Dieser frühe Peak war unabhängig vom Gewebetyp in jedem Patienten nachweisbar. Ein zweiter absorptionsspektrometrischer Peak eluierte bei 24 min. Dieser konnte durch Addition von Protoporphyrin IX-Standardlösung akzentuiert werden. Dieser zweite Peak war in kolorektalen Primärtumoren und in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe deutlich erhöht (Abbildung 5.1). In Kapitel 6.3.2 sind die Fluoreszenzemissionsspektren des spät eluierenden Peaks wiedergegeben.

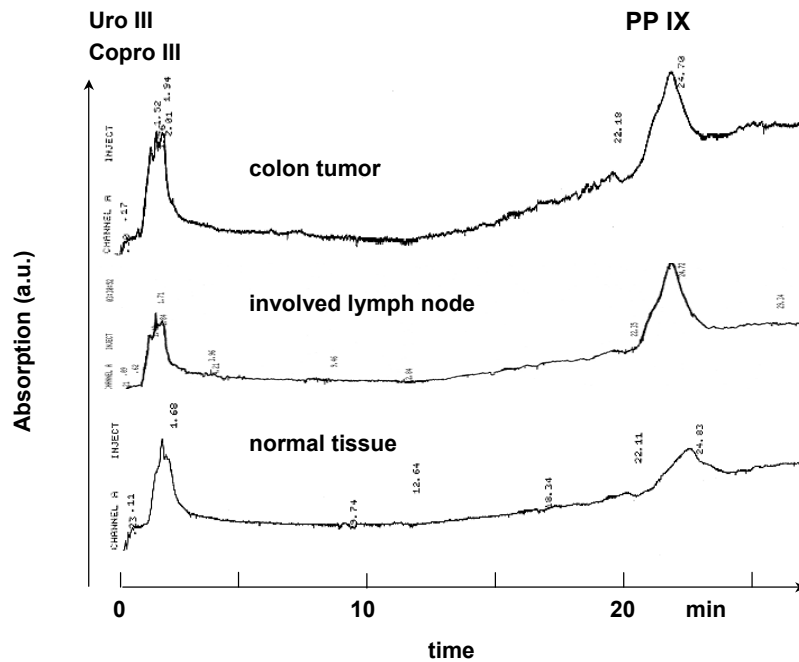


Abbildung 5.1 HPLC-Elutionskurven nach Porphyrinextraktion aus Gewebe aus einem Kolonkarzinom (oben), einer regionären Lymphknotenmetastase desselben Tumors sowie aus kolon-Normalschleimhaut. Alle Proben weisen im Wesentlichen gleiche Uroporphyrin III und Koproporphyrin III peaks auf, lediglich der PpIX peak ist in Primärtumor und Metastase deutlich höher als im Normalgewebe

5.4 Diskussion

Die Identität des Fluorophors ergibt sich aus der gemeinsamen Betrachtung der Ergebnisse der biochemischen Chromatographie mit denen der fluorimetrischen Charakterisierung. Die Diskussion erfolgt daher gemeinsam im Kapitel 6

6 Fluorimetrische Charakterisierung des einer tumorspezifischen Autofluoreszenzkomponente zugrunde liegenden Fluorophors

6.1 Grundlagen

Fluoreszierende Moleküle sind im biologischen Milieu relativ selten. Die Mehrzahl der die breite, unspezifische Gewebefluoreszenz ausmachenden Fluorophore (s. Tabelle 4.1) hat ihre Anregungsmaxima im ultravioletten oder im blauen sichtbaren Spektralbereich. Fluorophore mit Fluoreszenzemissionsbanden oberhalb 600 nm sind mit hoher Wahrscheinlichkeit den Porphyrinen zuzuordnen. Wie die chromatographischen Untersuchungen zeigten, kommen hier im Tumorgewebe im wesentlichen Uro-, Kopro- und Protoporphyrine in Betracht. Diese Substanzen sind anhand ihrer Fluoreszenzspektren unterscheidbar. Es war hier nun zunächst unsere Aufgabe, die spektrale Identität der Fluorophore zwischen Primärtumor und Metastase zu beweisen, sodann die erhaltenen Spektren sowohl der ex vivo-Proben

wie der Eluate aus der HPLC mit der spektralen Emission von chemisch definierten Standardlösungen von Uroporphyrin III, Koproporphyrin III und Protoporphyrin IX zu vergleichen.

Für die Untersuchung der spektralen Kongruenz waren jedoch mathematische Verfahren zu entwickeln, um die Anteile der langlebig fluoreszenzemittierenden Fluorophore an den verzögert aufgezeichneten Gesamtspektren möglichst zu isolieren, um die spektralen Charakteristiken auch in den Spektren mit niedrigem Signalanteil klar hervorzuarbeiten.

6.2 Material und Methodik

Fluoreszenzspektren wurden von kolorektalen Tumoren, ihrer umgebenden Normalschleimhaut und von regionären Lymphknotenmetastasen gemessen. Die Proben stammen aus der im Kapitel 8.3.3 dargestellten Patientenserie. Für die hier dargestellten Spektren wurden nicht ideale, sondern für die Gesamtheit der Daten repräsentative, typische Fälle ausgewählt.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Nachweis der spektralen Identität der Fluorophore in Tumor, Normalschleimhaut und Metastase

Die nach Absatz 3.4.1 transformierten Spektren von Tumor- und Normalschleimhaut (Abbildung 6.1a) sowie von Lymphknotenmetastase und Tumor (Abbildung 6.1b) sind kongruent. Trotz der Einschränkung der streng genommen fehlenden quantitativen Vergleichbarkeit muss hier dennoch darauf hingewiesen werden, dass

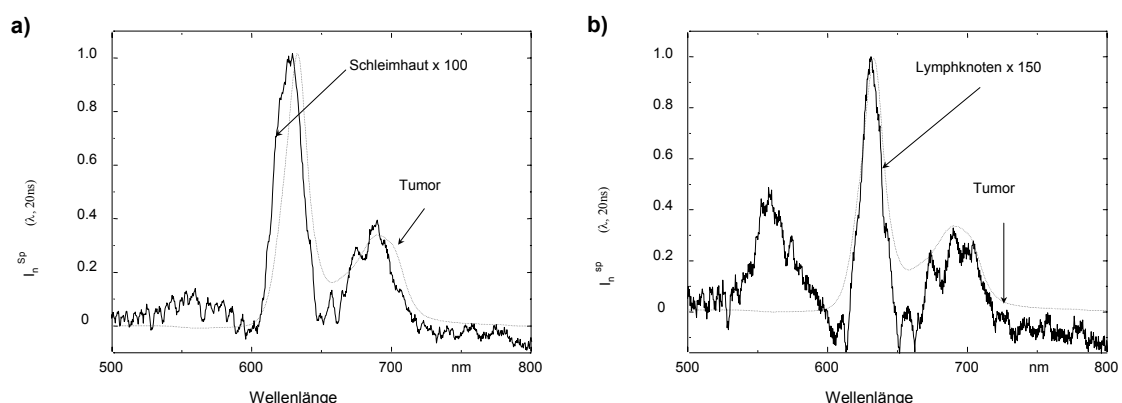


Abbildung 6.1 Die Abbildung der normierten spezifischen Fluoreszenzintensität erlaubt den exakten spektralen Vergleich der spezifischen Fluoreszenzspektren zwischen a) Tumor und Normalschleimhaut und b) Tumor und Lymphknotenmetastase. Spektral sind die zugrundeliegenden Fluorophore identisch

bei ex vivo annähernd gleichen geometrischen Untersuchungsbedingungen die Spektren der Normalschleimhaut um einen Faktor 100, die Spektren über der Lymphknotenmetastase um einen Faktor 150 verstärkt werden mussten, um mit dem Tumorspektrum in Deckung gebracht zu werden.

6.3.2 Spektrometrische Charakterisierung

Die spektralen Charakteristika der Substanz im Emissionsspektrum sind konstant mit einem primären Emissionspeak bei $\lambda_{\text{ex}} = 630 \text{ nm}$ und einem sekundären Emissionspeak bei ca. 690 nm. Das Exzitationsspektrum weist im überprüften Bereich zwei Banden bei $\lambda_{\text{ex}} \approx 510 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex}} \approx 545 \text{ nm}$ auf. Die Exzitationsbanden sind deckungsgleich sowohl für $\lambda_{\text{obs}} = 635 \text{ nm}$ wie für $\lambda_{\text{obs}} = 690 \text{ nm}$ (Abbildung 6.2).

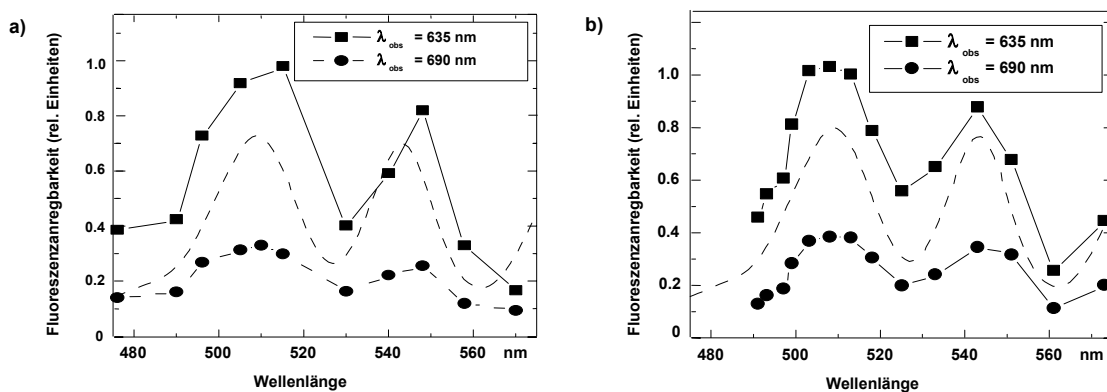


Abbildung 6.2 Die Exzitationsspektren belegen die Anregbarkeit sowohl der Emissionsbande bei $\lambda_{\text{obs}} = 630 \text{ nm}$ wie der Emissionsbande bei $\lambda_{\text{obs}} = 690 \text{ nm}$ durch Q-Banden um $\lambda_{\text{ex}} \approx 505 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex}} \approx 545 \text{ nm}$. Gestrichelt ist das Exzitationsspektrum von Protoporphyrin IX in Lösung dargestellt. Die Anregungsbanden sind identisch (a) kolorektaler Primärtumor, b) kolorektale Lymphknoten-Metastase).

Sie sind ebenfalls identisch zwischen kolorektalem Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Diese Exzitations- und Emissionscharakteristik entspricht den Exzitations- und Emissionsspektren von Protoporphyrin IX in Methanol (Abbildung 6.3). In Abbildung 6.4 sind die Fluoreszenzemissionsspektren von Protoporphyrin IX, Koproporphyrin III und Uroporphyrin III in Methanol dargestellt. Es zeigt sich, dass die Emissionspeaks von Kopro- und Uroporphyrin III wesentlich kurzwelliger sind als die des Protoporphyrin IX (Koproporphyrin III $\lambda_{\text{ex}} = 610 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}2} = 675 \text{ nm}$, Uroporphyrin III $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}2} = 675 \text{ nm}$, Protoporphyrin IX $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$,

$\lambda_{\text{ex}2} = 695 \text{ nm}$). Die Spektren von Koproporphyrin und Uroporphyrin decken sich daher nicht mit der beobachteten spektralen Charakteristik der Tumoren.

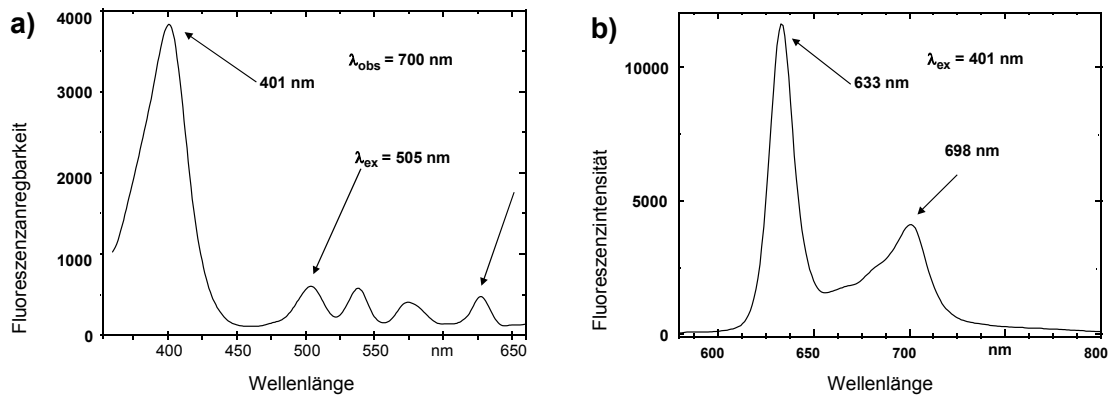


Abbildung 6.3 a) Fluoreszenzexcitationsspektrum ($\lambda_{\text{obs}} = 700 \text{ nm}$) und b) Fluoreszenzemissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 401 \text{ nm}$) von Protoporphyrin IX ($4 \mu\text{M}$) in Methanol

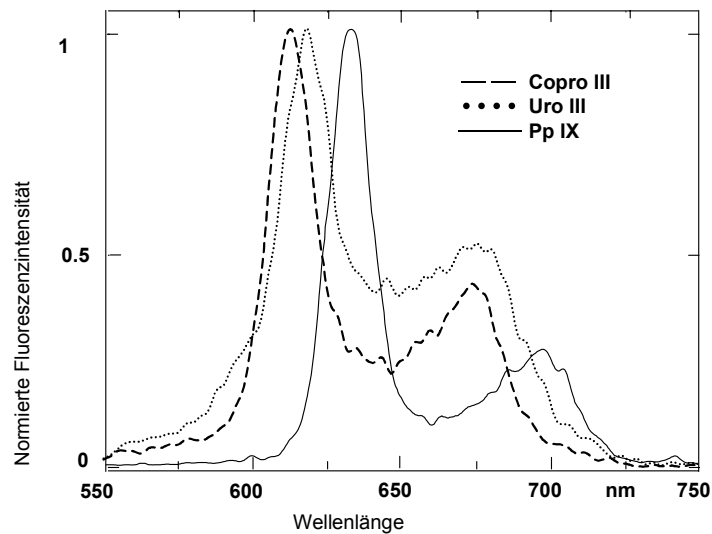


Abbildung 6.4 Fluoreszenzemissionsspektren von Protoporphyrin IX, Copro- und Uroporphyrin III in Methanol. Das PpIX-Spektrum ist mit den Spektren der späten Eluate aus dem Tumorgewebe und mit den ex-vivo registrierten Fluoreszenzspektren von kolorektalen Primärtumoren und Metastasen praktisch deckungsgleich.

Abbildung 6.5 stellt die Emissionsspektren der späten HPLC-Eluate von Porphyrinextrakten aus Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Normalschleimhaut dar. Alle drei Kurven (da in Lösung gemessen wurde, ist ein

quantitativer Vergleich möglich) entsprechen in ihrer spektralen Konfiguration dem Protoporphyrin IX-Spektrum, wobei die Intensität in Primärtumor und Lymphknotenmetastase über der Intensität in der Normalschleimhaut liegt.

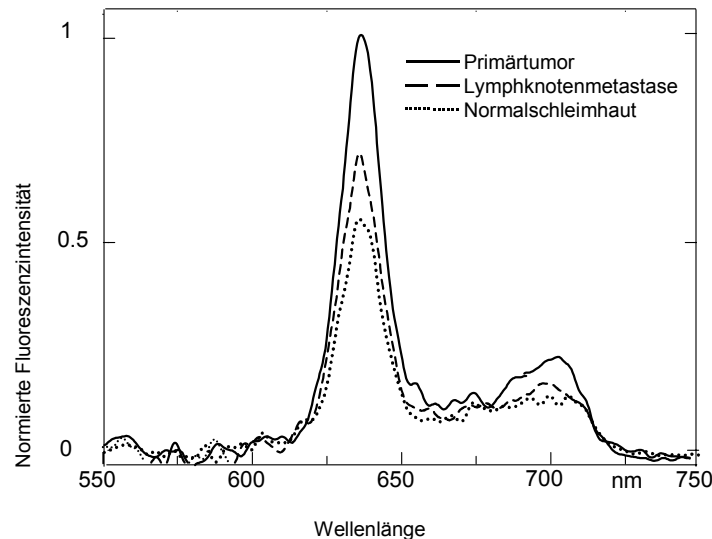


Abbildung 6.5 Emissionsspektren der chemisch extrahierten Porphyrine aus Abbildung 5.1

6.4 Diskussion

Porphyrine bakteriellen Ursprungs mögen zum Fluoreszenzsignal der endoluminalen Oberfläche von kolorektalen Karzinomen deutlich beitragen. Die spezifische, Protoporphyrin IX-typische Autofluoreszenz war aber in allen untersuchten Tumorgeweben nachweisbar, unabhängig davon, ob diese einer bakteriellen Kolonisierung ausgesetzt waren und persistierte auch nach sorgfältigem Spülen. Die spektrale Kongruenz der Emissions- und Exzitationsspektren mit den ex vivo gemessenen Vergleichsspektren chemisch reinen Protoporphyrins belegt ebenso wie die chromatographischen Versuche die Präsenz von Protoporphyrin IX im Tumorgewebe. Eine solche endogene Akkumulation von Protoporphyrin IX erscheint im Licht wachsender Erkenntnis über den Mechanismus der Protoporphyrin IX-Akkumulation nach Substitution von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) durchaus logisch. So wird im Zusammenhang mit dieser 5-ALA-induzierten Protoporphyrin IX-Akkumulation eine reduzierte Aktivität der Ferrochelatase, des Enzyms, das Protoporphyrin IX durch Inkorporation eines Eisenatoms zu Häm katalysiert, diskutiert [105, 106, 107, 108, 109]. Diese Aktivitätsreduktion soll nach Literaturangaben von einem Faktor 3 für Kolonkarzinome im Vergleich zu Lebergewebe [105] bis zu einem Faktor 50 für Hepatome im Vergleich zu normalem

Lebergewebe [110] reichen. Diese geringere metabolische Aktivität kann zum einen auf das Überwiegen glycolytischer Prozesse über oxidative Phosphorylation [111] erklärt werden. Es kann aber auch Ausdruck von genetischen Veränderungen im Ferrochelatase-Gen sein, da viele solcher Mutationen als Grundlage der genetisch determinierten erythropoetischen Protoporphyririe bekannt sind [112, 113]. Eine alternative Hypothese postuliert einen Mangel an intrazellulär verfügbarem Fe^{2+} möglicherweise auf der Basis einer erhöhten Zellteilungsrate [114]. Dies wird unterstützt durch Beobachtungen, dass die Protoporphyrin IX - Bildung in Zelllymphknotenulturen durch Gabe von Eisenchelatoren gesteigert werden konnte [115]. [116, 117]

Andere Autoren fanden keine deutliche Korrelation zwischen der Pp-IX-Bildung nach 5-ALA-Zufuhr und der zellulären Proliferationsrate von Tumorzellen in vitro. Sie postulierten Unterschiede im Pp-IX-Efflux der Zellen [115]. Eine weitere Möglichkeit der enzymatischen Disregulation stellt eine erhöhte Aktivität der Porphobilinogendeaminase dar. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Uroporphyrinogen III aus 4 Molekülen Porphobilinogen, würde also auf der Substratseite der Ferrochelatase zu einem Überangebot führen. Eine solche Überexpression wurde von *Hinnen et al.* in Malignomen des Ösophagus sowie in Barrett-Schleimhaut nachgewiesen [118]. *Gibson et al.* zeigten die Induzierbarkeit des Enzyms Porphobilinogendeaminase durch 5-ALA und postulierten ebenfalls, dass die Porphobilinogendeaminase das entscheidende Schlüsselenzym für die Bildung von Protoporphyrin IX aus einem 5-ALA-Exzess sei [119]. Gerade diese letzte Arbeit belegt jedoch, dass die Betrachtung des Häm-Syntheszyklus nach Administration von 5-ALA ganz anders zu interpretieren ist, als die von uns beobachtete Auto-Akkumulation von Protoporphyrin IX in vivo in einem Zellsystem, dessen Regulationsmechanismen nicht durch abnormal hohe Zufuhr eines Zwischensubstrates außer Kraft gesetzt werden. Bezüglich der Natur des identifizierten Fluorophors ist die Vielzahl der Hinweise auf systematische Alterationen im Häm-Synthesestoffwechsel bei malignen Tumoren jedoch als untermauerndes Argument für das Vorhandensein von Protoporphyrin IX zu verstehen. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung konnte postuliert werden, dass kolorektale Tumorzellen unabhängig von einer bakteriellen Kolonisation Protoporphyrin IX akkumulieren.

7 Molekulare Ursachen der endogenen Akkumulation von Protoporphyrin IX im Tumorgewebe

7.1 Einleitung

In Anbetracht der im vorangegangenen (Kapitel 5 und 6) konstatierten endogenen Protoporphyrin IX-Akkumulation in kolorektalen Tumorgeweben und in Anbetracht des zunehmenden Interesses an den Mechanismen einer Protoporphyrin IX-Akkumulation aufgrund externen 5-ALA-Überschusses [87, 88, 120, 121] lag es auf der Hand, an unserem nicht durch exogene 5-ALA Zufuhr deregulierten System den Ursachen der Protoporphyrin IX-Akkumulation weiter auf den Grund zu gehen. Hierbei fokussierten wir unser Interesse zunächst auf die enzymatische Seite, und hier auf die zwei vermeintlichen Schlüsselenzyme Porphobilinogendehaminase und Ferrochelatase, deren Expression und Aktivität in Tumor- und Normalgewebe verglichen werden sollte.

7.2 Material und Methodik

7.2.1 Reagenzien und Kits

Primer Oligonucleotide wurden mit einem automatischen DNA Synthetisator Applied Biosystems 380B hergestellt und nach HPLC Aufreinigung (BioTez, Berlin, Germany) verwendet.

Hanks' Lösung und Trypsin/EDTA wurden von Biochrom (Berlin) bezogen; DEPC-Wasser von Ambion (AMS, Wiesbaden), Farbstoff-Reagenzienkonzentrate für Proteinassays von Bio-Rad (München, Germany), T7 Transskriptionskits von Enzo Laboratories (Farmingdale, NY, USA), Phase Lock Gele von Eppendorf (Hamburg), Superscript II (SSII) reverse Transcriptase, Trizol LS Reagenz, Guanidine thiocyanate-phenol-chloroform, Ethidium-bromide, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Lipofectin, G418, Iscove's medium, fötales Kälberserum, Phosphatpuffer (PBS) und Glutamin für ZellLymphknotenulturen von GIBCO, Life Tech. (Eggenstein). Topo-pcDNA3.1 stammt von Invitrogen (Groningen, Netherlands); Ribo Green RNA Quantifizierungsreagens von Molecular Probes (Leiden, Netherlands). One-Step TaqMan PCR Kits enthielten AmpliTaq Gold DNA Polymerase, M-MLV reverse transcriptase, dNTPs und optimierte Puffer. MicroAmp® Optical 96-Well Reaktionsplatten und optische ‚caps‘ wurden von PE Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen; E. coli DNA Polymerase I, RNaseH, T4 DNA Polymerase von ProMega (Mannheim); AmpliTaq Polymerase von Perkin-Elmer

(Weiterstadt); RNeasy RNA-Extractions Kit, Qiagen Plasmid Maxiprep Kits; SuperFect and QiaEx-II Gel Extractions kits von Qiagen (Hilden), Ethidium-bromid, RNase-freie DNase, DNA Standards stammten von Roche (Mannheim); Agarose und Phenol/Chloroform von Roth (Karlsruhe, Germany); Lineares Polyacrylamid (GenElute LPA von SIGMA, München). Alle anderen Reagenzien wurden von Sigma (München) bezogen.

7.2.2 Patienten und Gewebeproben

Chirurgisch gewonnene Gewebeproben wurden der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik entnommen. Für diese Proben sind umfassende klinische Daten entsprechend den WHO/UICC-Richtlinien vorhanden. Vor der Asservierung in der Tumorbank war malignes Tumorgewebe von der umgebenden Normalschleimhaut separiert worden. Nur makroskopisch vital erscheinende Tumoranteile waren asserviert worden. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die PCR-Analysen wurde Tumor- und Normalgewebe von jeweils 15 Kolon- und Rektumkarzinomen nach dem Zufallsprinzip selektiert. Zum Vergleich wurden auch Gewebeproben von Tumoren des Ösophagus (Plattenepithelkarzinome) und des Magens untersucht. Für die Genchip-Untersuchungen wurden 3 Patientengruppen gepoolt untersucht:

1. Kolonschleimhaut gesunder Patienten, die sich einer flexiblen Koloskopie mit negativem Ergebnis unterzogen (Normal),
2. Kolongewebe von Kolonkarzinompatienten mit guter Prognose (Low Risk) und
3. Kolongewebe von Kolonkarzinompatienten mit ungünstiger Prognose (High Risk) (Tabelle 7.1).

Die Low Risk-Gruppe war determiniert durch ein $pT \leq 2$, die Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen (pN0) und die Abwesenheit von Fernmetastasen (M0). Im dokumentierten Verlauf durfte kein Tumorrezidiv oder Zweitkarzinom aufgetreten sein.. Das mittlere Überleben in der Low Risk-Gruppe beträgt 40 Monate, das mediane Alter beträgt 68 Jahre. Das mittlere Überleben in der High-Risk-Gruppe beträgt 27 Monate, das mediane Alter ist 74 Jahre.

Tabelle 7.1 Histopathologische Daten der ‚low-risk‘- und der ‚high-risk‘ Patientengruppe. Histopathologische Klassifikation nach TNM, Jahr: Jahr der Primärtumorresektion, Alter in Jahren, ‚Lebt‘ im September 2001, Überleben in Monaten nach Primärtumorresektion, Metastasen bezeichnet asynchron aufgetretene Metastasen

Nr.	Jahr	Alter	T	N	M	G	L	V	Lebt	Überleben	Metastasen	Rezidiv
'low-risk' Gruppe:												
1101	1997	63	2	0	0	2	0	0	Ja	36	Nein	Nein
1140	1996	73	1	0	0	2	0	0	Ja	48	Nein	Nein
1927	1997	75	2	0	0	2	0	0	Ja	37	Nein	Nein
2379	1999	58	1	0	0	2	0	0	Ja	24	Nein	Nein
2918	1996	67	2	0	0	2	0	0	Ja	54	Nein	Nein
'high risk' Gruppe:												
181	1997	73	1	0	0	1	0	0	Nein	29	Ja	Ja
817	1996	84	3	0	0	3	0	0	Nein	19	Nein	Ja
891	1996	70	3	1	1	2	2	0	Nein	21	Nein	Nein
902	1998	75	2	0	0	2	0	0	Ja	30	Nein	Nein
1903	1997	68	1	0	0	2	0	0	Ja	36	Nein	Nein

7.2.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Porphobilinogen-Deaminase (PBG-D)

Zur Aktivitätsbestimmung der PBG-D wird die Absorption von Uroporphyrin gemessen, das nach lichtinduzierter Oxidation aus Uroporphyrinogen, dem Produkt der enzymatischen Deaminierungsreaktion entsteht. Gewebe wird homogenisiert (1:5 w/v) in 0,05M Tris-HCl, pH 7,4, zentrifugiert bei 1000xg für 15 min. Überstand (2mg Protein) wird 30 min bei 45 ° C in der Dunkelheit mit 1,0 ml Porphobilinogen im Konzentrationsbereich von 0 - 500uM inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 2 ml Ethylacetat/Essigsäure(3:1,v/v). Die Mischung wird bei 3000 g zentrifugiert und bei Raumtemperatur 15 min in Dunkelheit inkubiert. In der oberen Schicht befinden sich die Porphyrine (1,6 ml). Sie werden mit 1 ml 0,5M Salzsäure gemischt und zentrifugiert bei 3000 g für 10 min. Die Uroporphyrinabsorption der unteren Phase wird dann bei 405 nm vermessen. Die Aktivität wird ausgedrückt in pmol gebildetem Uroporphyrin pro mg Protein.

7.2.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Ferrochelatase (FC)

Zur Aktivitätsbestimmung wird der Einbau von Zink in Protoporphyrin IX gemessen, wobei die Konzentrationen der Porphyrine mit HPLC ermittelt werden (modifiziert nach [105]. Gewebe wird 1:10 mit Wasser verdünnt und homogenisiert. 50 ul des Homogenats werden zu 100 ul einer 0,25 mol/l Tris-HCl Lösung, pH 8,2, gegeben, die in 100 ml noch 1,16 ml Triton X-100 und 45 mg Palmitinsäure enthält. Dazu gibt man nun 50 ul 250 mM Protoporphyrin IX und 50 ul 200 mM Zinkacetat. Die

Inkubation erfolgt bei 37 °C für 60 min im Thermoblock. Zugabe von 1 ml Dimethylsulfoxid-Methanol (30:70) stoppt die Reaktion. Die Reaktionsmischung wird 5 min bei 15000 Upm zentrifugiert und der Überstand für die HPLC eingesetzt. Die Messung erfolgt im Bereich von 415-580 nm. Die Enzymaktivität wird in nmol Zn-PpIX je mg Protein je Stunde angegeben.

7.2.5 Lasermikrodissektion

Kryostatschnitte der Proben aus der Tumorbank wurden einem abgekürzten Hämatoxylin-Färbeprozess unterzogen und von einem Pathologen beurteilt. Nur solche Schnitte, die den jeweils gesuchten Gewebetyp enthielten, wurden für die Lasermikrodissektion verwandt. Hierfür wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte in 70%igem Äthanol für eine Minute fixiert und dann mit RNase-freier Hämatoxylinlösung für zwei Minuten angefärbt, danach mit DEPC-Wasser für 30 Sekunden, mit PBS für eine Minute, sowie wieder mit DEPC-Wasser für 30 Sekunden, dann mit 70% Äthanol für eine Minute gespült. Es folgten zwei weitere Spülungen mit 95% Äthanol und 100% Äthanol für jeweils eine Minute. Die Spülphasen wurden auf die minimale Zeit reduziert, um RNA-Verlust und Degradation zu vermeiden. Kolonkryptenepithelium- resp. Tumorzellen wurden in den Kryostatschnitten identifiziert und mittels eines SL-Microtest-LCM-Systems (Jena) isoliert. Es wurden jeweils Proben mit mehreren hundert epithelialen oder Tumorzellen gebildet.

7.2.6 RNA Isolation

Die Gesamt-RNA Isolation wurde mittels Trizol LS Reagens unter Zugabe von linearem Polyacrylamid durchgeführt (GenElute LPA, SIGMA, München). Die präzipitierte RNS wurde zweimal mit 70%igem Äthanol gewaschen und in Wasser resuspendiert. Proben von fünf Geweben jeden Typs (Normal, ‚low risk‘ oder ‚high risk‘) wurden gepoolt und ein zweites Mal mit Äthanol präzipitiert, um das Volumen für die cDNA-Synthese zu reduzieren. Die Gesamt-RNA Menge wurde mittels Ribo Green RNA Quantifikationsreagens (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ermittelt.

7.2.7 Herstellung biotinylierter cRNA-Sonden für die Genchip Hybridisierung

Etwa 2 µg Gesamt RNA (10 µl) wurden unter Zugabe von 1 µl (500 ng/ µl) eines verankerten oligo(dT) Primers mit dem T7 RNA Polymerase Promoter T7-primer 1 [5' GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(T)₂₄ für 10 min. auf

70 °C erhitzt, dann eisgekühlt und für 1 h bei 42 °C revers transkribiert mit 400 U Superscript II (SSII) Reverse Transcriptase, 1 µl dNTP mix (10 mM), 2 µl DTT (0.1 M) and 4 µl 5X First strand cDNA Puffer. Die Second strand Synthese wurde durch Zufuhr von 30 µl 5X second-strand buffer (100 mM Tris-HCl, 225 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂, 0.125 mg/ml BSA, 7.5 mM DTT), 3 µl dNTP (10mM), 4 µl *E. coli* DNA polymerase I (10 U/ µl), 1 µl RNaseH (2U/ µl) und 91 µl DEPC-H₂O unter Inkubation für 2 h bei 16 °C durchgeführt. Die resultierende cDNA wurde für 10 min. bei 16°C mit 2 µl T4 DNA Polymerase (10 U/ µl) behandelt, sodann mit Phenol/Chloroform und Phase Lock Gel extrahiert, zweimal mit 70% Äthanol gewaschen und in DEPC-Wasser resuspendiert.

Die T7 RNA-Polymerase basierte Biotinylierung wurde mit dem T7-Transcriptionskit von Enzo Laboratories nach Herstellervorschrift durchgeführt. Die biotinylierte RNA wurde in RNeasy Zentrifugationssäulen aufgereinigt, zweimal mit 40-50 µl H₂O gelöst, präzipitiert und in 14 µl H₂O resuspendiert. Die cRNA Menge wurde mit Ribo-Green quantifiziert und durch Gel Elektrophorese durch ein 1% Agarose Gel kontrolliert. Die Fragmentation wurde entsprechend dem Affymetrix GeneChip Manual vorgenommen.

7.2.8 Genchip Hybridisierung

Antisense RNA-Proben wurden auf den Affymetrix Microarray-Genchips hybridisiert, im Speziellen dem Hu95-Satz, der eine Gesamtzahl von annähernd 60 000 humanen Transkripten repräsentiert. Hybridisierung, Waschen und Scannen der Microarrays wurden entsprechend den Affymetrix-Empfehlungen (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) durchgeführt. Für die Analyse der Expressionsdaten wurde die Genchip-Analyse-Software-Version 3.3 von Affymetrix benutzt. Alle Microarray-Chips wurden auf eine Intensität von 1000 skaliert und zeigten sich vergleichbar hinsichtlich Hintergrund, Rauschen und Gesamtfärbung. Differentiell exprimierte Transkripte wurden auf der Basis von Affymetrix-eigenen Algorithmen, die sich an den Hybridisierungssignalen von Kontroll-Oligonucleotiden mit jeweils einem einzelnen ausgetauschten Nukleotid kalibrieren, von der Software identifiziert.

Eine tatsächliche Expression wurde angenommen, wenn der Algorithmus einen „Present-call“ (P) berechnete. In Tabelle 7.3 sind außer diesem „Call“ die

normalisierten Expressionen, bezogen auf die Gesamtfluoreszenz per Chip, angegeben.

7.2.9 Quantitative 5'-Nuclease RT-PCR Analyse

Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (PE-Applied Biosystems), basierend auf den Sequenzdaten der EST-Sequenzen entwickelt. Sonden für die Detektion der humanen Ferrochelatase wurden mit einem fluoreszierenden Marker (6-carboxy-fuorescein, FAM) und einem Quencher-Farbstoff (6-carboxy-tetra-methylrhodamine, TAMRA) gelabelt. Die Sonden für die Detektion des Standard- β -actin, β -actin Primer und eine Sonde mit dem Fluoreszenzlabel VIC wurden von PE-Applied Biosystems (huBeta-Actin) bezogen. Expressionslevel der humanen Ferrochelatase wurden mit Hilfe der folgende Primerpaare und Sonden bestimmt:

QFC5.S: **FAM**- TGA AGA GAT GGA GAG AGA TGG CCT AGA AAG G -**TAMRA**

FC-Q3f : TGGATTTCGGTACGTCCATC

FC-Q3r : ACTGTGGATACTGTGTGAAAGCAATAG

Die Spezifität der Produkte wurde für jedes Fragment durch Schmelzkurvenanalyse, Gel-Elektrophorese und in einigen Fällen durch Sequenzierung belegt. mRNA-Proben der Kolongewebe wurden mittels Lasermikrodissektion und RNA-Isolation (RNeasy-extraction Kit, Qiagen), wie oben beschrieben, hergestellt. Die Proben wurden auf die Expression von Beta-Aktin normiert und die relative Transkriptmenge gemessen. Die RT-PCR-Reaktionen wurden durchgeführt, aufgezeichnet und analysiert mit Hilfe des ABI-7700-Prisma-Sequenz-Detektionssystem (PE-Applied-Biosystems). Die Reaktionen wurden jeweils drei Mal durchgeführt, jede davon in Triplikaten. Nach reverser Transkription für 30 Minuten bei 48 °C wurde die Reaktionsmischung bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert. Hierauf folgten 40 PCR-Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden und bei 60 °C für eine Minute in jedem Zyklus in Anwesenheit der FAM-gelabelten Oligonukleotid-Sonden. Nach Erreichen der Zielamplifikation wurde die Sonde zwischen den Reporter- und Quencherfarbstoffen durch die nukleolytische Aktivität der Polymerase aufgetrennt. Die Produktmenge, detektiert durch Fluoreszenz, ist in jedem Zyklus innerhalb der exponentiellen Phase der PCR proportional zur initialen Anzahl vorhandener mRNA-Stränge. Die Anzahl

der PCR-Zyklen (der Schwellenzyklus), die erforderlich sind, um das Amplikon zu detektieren, ist daher direkt proportional der mRNA-Konzentration in der Probe. Die Quantifizierung der mRNA-Expression in den Gewebeproben wurde daher durch Kalibrierung des PCR-Schwellenzyklus aus den Gewebeprobenmessungen mit einer Standardkurve durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PCR-Reaktionsprodukte der ST-6-Gall-1, ST-6-Gall-nak-2 und Beta-Aktin von SW 480 kolorektalen Karzinomzellen amplifiziert und in den Vektor TOPO-pc_DAN 3.1 (Invitrogen) kloniert. Die Standardkurve wurde aus Verdünnungsreihen der Plasmide von 10^6 Molekülen bis herab zu 10 Molekülen durch Bildung des log gegen den Schwellenzyklus determiniert. Die Molekülzahlen für die unbekannten Proben wurden aus der Regression entsprechend der Formel

$$\log N = (C_T - b) / m,$$

berechnet (C_T ist der Schwellenzyklus, b der y-Achsenabschnitt und m die Steigung der Standard-Kurve).

Da die Probe und das Beta-Aktin in getrennten Röhrchen amplifiziert wurden, wurde die Mittelwertbildung für Probe und Beta-Aktin separat durchgeführt. Die normierte Menge ST6-Gall-1 und ST-6-Gall-nak-2-Expression wurde im Vergleich der durchschnittlichen Probenwerte mit den unterschiedlichen Beta-Aktin-Werten errechnet.

7.2.10 Zellkultur

Humane Kolonkarzinom-Zelllinien SW 480 and LS 174T wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin unter Zusatz von Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin) bei 37°C bei 6 % CO₂ kultiviert.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Porphobilinogendeaminase(PBGD) mRNA-Expression und enzymatische Aktivität

Die PBGD mRNA-Expression wurde in jeweils 15 Fällen von Kolon- und Rektumkarzinomen im Vergleich zur umgebenden Normalschleimhaut mit Bezug auf β -Aktin quantifiziert. Die mittlere Anzahl von PBGD mRNA-Molekülen / Zelle beträgt im Tumorgewebe 1591 Kopien und im Normalgewebe 1665 Kopien, d.h. wir fanden keinen signifikanten Unterschied der Expression der PBG-D zwischen Tumor und Normalgewebe. Das Gleiche gilt für die enzymatische Aktivität, die bei 1,98 pmol Uroporphyrin/mg Protein für das Normalgewebe und bei 2,34 pmol Uroporphyrin/mg

Protein im Karzinomgewebe lag. Auch auf Proteinniveau konnte also kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

7.3.2 Ferrochelatase mRNA-Expression und enzymatische Aktivität

Die mittels quantitativer single-step multiplex RT-PCR ermittelte Ferrochelatase-Expression in Relation zu β -Aktin ist in allen untersuchten gastrointestinalen Tumorentitäten gegenüber der jeweiligen Normalschleimhaut deutlich und signifikant vermindert (siehe Tabelle 7.2, Wilcoxon-test, *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Für Kolon- und Rektumkarzinome wurde die Expression zusätzlich auf ein anderes ‚Housekeeping‘-Gen, die Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT) bezogen. Hier ist der Unterschied bei ebenfalls sehr geringer Standardabweichung noch deutlicher (nicht dargestellt). Entsprechend ist auch die enzymatische Aktivität der Ferrochelatase in Kolonkarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe verringert und zwar von 62 nM ZnPPIX/mg Protein auf 46 nM ZnPPIX/mg Protein. Aufgrund der hohen Varianz der Werte erreicht der Unterschied in der untersuchten Stichprobe nicht Signifikanzniveau. Eine weitere Untersuchung mit höherer Fallzahl wird gegenwärtig durchgeführt, um die beobachtete Tendenz statistisch abzusichern.

Die mittels quantitativer reverse Transkriptase-PCR ermittelte Ferrochelatase-Expression in Relation zu β -Aktin ist in allen untersuchten gastrointestinalen Tumorentitäten gegenüber der jeweiligen Normalschleimhaut signifikant vermindert (Wilcoxon-test, $p < 0.05$ - $P < 0.01$). Für Kolon- und Rektumkarzinome wurde die Expression zusätzlich auf ein anderes ‚Housekeeping‘-Gen, die Hypoxanthinribosyltransferase (HPRT) bezogen. Hier ist der Unterschied bei ebenfalls sehr geringer Standardabweichung noch deutlicher. Der Betrag des Unterschiedes in der prozentualen Expression mag zwar mit 3-7% gering erscheinen, auf der Proteinebene kann dieser mRNA-Expressionsunterschied jedoch deutliche Differenzen verursachen. Entsprechend ist auch die enzymatische Aktivität der Ferrochelatase in Kolonkarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe verringert und zwar von 0,062 uM ZnPPIX/mg Protein auf 0,046 uM ZnPPIX/mg Protein. Möglicherweise bedingt durch die Schwankungsbreite des Tests in Biopsiematerial (ca. 80 %) war dieser Unterschied nicht signifikant.

Tabelle 7.2: Ferrochelatase mRNA-Expression in Relation zu β -Aktin (HPRT)

	N	Karzinomgewebe	N	Normalschleimhaut
		FC Kopien/ Zelle		FC Kopien/ Zelle
Ösophagus	18	85.01	18	103.38*
Magen	20	59.21	20	253.32**
Kolon	15	63.03	15	103.04**
Rektum	15	79.51	15	134.49*

Angegeben ist die Anzahl der mRNA-Moleküle der Ferrochelatase (FC) bezogen auf die Menge des Housekeeping-Gens β -actin in HT-29 Zellen, die als Referenz mitgeführt wurden. Untersucht wurden jeweils Proben aus dem Karzinom und der nicht betroffenen Mukosa desselben Patienten. Alle Reaktionen wurde mit der single-step multiplex Methode ausgeführt wie unter Material& Methoden beschrieben.

7.3.3 Genchip Hybridisierung

Die Ergebnisse (Tabelle 7.3) zeigen eine Abnahme der Expression sowohl der ALA-S (Heme-1) wie der Hämoxygenase im Tumor. Dagegen ist sowohl die Expression der PBG-D (Heme-3) und der Uroporphyrinogen-Synthase wie der Koproporphyrinogenoxidase im Tumor erhöht, was für eine verstärkte Hämsynthese spricht. Keine Aussage kann zur Ferrochelatase gemacht werden, da die Expression zu gering (A) ist.

Tabelle 7.3 Affymetrix Genchip-Hybridisierung Vergleich der Enzymexpressionen des Hämstoffwechsels zwischen gepooltem Gewebe von Kolon-Normalschleimhaut gesunder Patienten (NORMAL), sowie Tumorgewebe von Kolonkarinomen aus einer ‚low-risk‘ (LOW) und einer ‚high-risk‘-Gruppe (HIGH). (Biotin-markierte Antisense-RNA, die aus mRNA von Biopsiematerial hergestellt (entsprechend dem Affymetrix GeneChip Manual) wurden mit Microarrays des Typs U95A hybridisiert, mit dem es möglich ist 12626 humane Transkripte nachzuweisen. Dargestellt ist die normalisierte Fluoreszenz der Transkripte in Bezug auf die Intensität des gesamten Chips und die Bewertung ob das Transkript präsent (P) oder abwesend (A) ist, nach dem Algorithmus der Affymetrix Microarray Suite 5.0. Weitere Abkürzungen: Probe Set, Affymetrix-Identifizier des immobilisierten Oligonukleotids; Genbank, Genbank Accessionnummer der Sequenz; Description, Bezeichnung des Enzyms des Hämstoffwechsels.

Probe Set	Normal	Low	High	Enzym	Genbank	Beschreibung
37285_at	1,688 A	0,774 A	0,866 A	Heme-0	X60364	5-aminolevulinate synthase precursor
37674_at	3,037 P	0,711 P	0,603 P	Heme-1	Y00451	5-aminolevulinate synthase
34506_at	1,325 A	0,769 A	1,650 A	Heme-2	M13928	delta-aminolevulinate dehydratase
37649_at	0,496 A	2,255 P	0,891 P	Heme-3	M95623	hydroxymethylbilane synthase (PBG-D)
36652_at	0,562 A	1,500 P	1,514 P	Heme-4	J03824	uroporphyrinogen III synthase
36653_g_at	0,602 A	1,630 A	1,585 A	Heme-4	J03824	uroporphyrinogen III synthase
37667_at	1,062 P	1,173 P	0,519 P	Heme-5	AF104421	uroporphyrinogen decarboxylase
37999_at	0,357 A	1,165 P	1,276 P	Heme-6	D16611	coproporphyrinogen oxidase
37098_at	0,901 A	1,296 P	0,984 A	Heme-7	D38537	protoporphyrinogen oxidase
33914_r_at	3,430 A	1,000 A	3,948 A	Heme-8	D00726	ferrochelatase
33802_at	31,730 P	0,820 A	0,530 A		Z82244	heme oxygenase 1

7.4 Diskussion

Die Ferrochelatase ist ein inzwischen sehr umfangreich charakterisiertes, der inneren mitochondrialen Membran assoziiertes Enzym. Das Gen ist auf Chromosom 18 in der Region q21.3 lokalisiert. Es umfasst 11 Exons bei einer Mindestgrösse von etwa 45 kb [122]. Die Tertiärstruktur ist kristallografisch geklärt [123], wobei ein C-terminaler [2Fe-2S] Cluster für die Funktion der humanen Ferrochelatase wesentlich scheint, bei der bakteriellen Ferrochelatase fehlt dieser. Eine Vielzahl von Punktmutationen mit konsekutivem Funktionsverlust sind beschrieben worden [112, 113, 124].

Da Häm-beinhaltende Enzyme für den Energie-Metabolismus essentiell sind, muss jede kernhaltige Zelle im Körper wenigstens eine geringfügige Kapazität für die Synthese von PpIX besitzen. Normalerweise ist die Hämsynthese so präzise reguliert, dass signifikante PpIX-Konzentrationen nicht akkumulieren können. Über diesen Regulationsmechanismus in anderen Geweben als der Leber und dem Knochenmark ist jedoch relativ wenig bekannt. In der Leber existiert ein Feed back-Mechanismus, durch den in Abhängigkeit von der Häm-Konzentration die Synthese von 5-ALA gesteuert wird [125]

Untersuchungen über die Aktivität der Ferrochelatase in Tumorgeweben resultieren aus der Beobachtung, dass unter exogener Zufuhr von 5-Aminolävulinsäure in Tumorzellen Protoporphyrin IX akkumuliert, das unmittelbar zu photodynamischer Therapie oder zu fluoreszenzdiagnostischen Zwecken genutzt werden kann [126]. Hierauf basierend haben eine Vielzahl von Gruppen im Wesentlichen durch enzymatische Aktivitätsbestimmungen versucht, die Ursachen für diese induzierte PpIX-Akkumulation zu erforschen. Eine erniedrigte Ferrochelataseaktivität ist schon 1984 als mögliche Ursache für eine Akkumulation allerdings exogener Porphyrine in Malignomen diskutiert worden [110]. Eine Ferrochelatase-Blockade durch chronische Blei-acetat Zufuhr führte in hauttumortragenden Mäusen zu einer therapeutisch nutzbaren PpIX-Akkumulation in den Tumoren [127]. *Van Hillegersberg et al.* beschreiben 1992 unseres Wissens nach erstmals eine hochsignifikant erniedrigte Ferrochelataseaktivität in einem Rattenmodell transplantierbarer Kolonkarzinome, allerdings gegenüber Lebergewebe (ratio 1:4) [105]. *Hinnen* beschreibt demgegenüber in neoplastischen Veränderungen der Speiseröhre eine normale bis leicht erhöhte Aktivität der Ferrochelatase bei aber deutlich gesteigerter Aktivität der Porphobilinogen-Deaminase. In der Imbalanz beider Enzymaktivitäten sieht er den Schlüssel für eine beobachtete PpIX-Akkumulation [118, 128]. Die Ursachen für die verminderte Ferrochelataseaktivität werden in diesen Arbeiten nicht geklärt. *Krieg* sieht Unterschiede in der PpIX-Akkumulation nach Zufuhr von 5-ALA zwischen Blasenkarzinomzelllinien, normalen Urothelzelllinien und Fibroblasten in Verbindung mit verminderter Ferrochelatase-Aktivität und vermindertem zellulären Eisen [129]. *Berg et al.* untersuchten an humanen Adenokarzinomzellen den Effekt einer Eisen-Depletion durch Eisen-Chelatoren (Desferrioxamin, EDTA) auf die PpIX-akkumulation in Abhängigkeit einer 5-ALA-Substitution. Die Eisendepletion führte zu einer von 1,5-fach (ALA-gesättigt) bis 3,5-fach reichenden (niedrige ALA-Konzentration) Erhöhung der PpIX Konzentration in den Tumorzellen [117]. Der Effekt von Desferrioxamin wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [116].

Auf der anderen Seite besitzt Desferrioxamin aber durch Interaktion mit dem Eisen-Schwefel-Cluster [2Fe-2S] am C-terminalen Ende der Ferrochelatase eine das Enzym direkt inhibierende Funktion [130], sodass die Aussage dieser Versuche bezüglich eines kausalen Effektes des Kosubstratmangels begrenzt ist.

Der Nachweis einer quantitativen Minderexpression der Ferrochelatase auf mRNA-Ebene in Malignomen im Vergleich zu ihren Ursprungsgeweben erfolgt hier erstmalig. Diese Beobachtung bietet sowohl den Schlüssel für eine weitergehende Erforschung der differentiellen Regulationswege der Häm-Synthese in Tumorgeweben wie das Potential einer gentherapeutischen Modulation zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken.

Darüberhinaus gibt die Affymetrix-Chipanalyse Hinweise auf weitere enzymatische Expressionsunterschiede. Neben einer erhöhten Expression der Häm-Synthesenzyme PBG-D, Uroporphyrinogen-Synthase und Koproporphyrinogen-Oxidase, die einer generellen Aktivierung der Hämsynthese entsprechen können, ist vor allem die deutliche Minderexpression von δ -Aminolävulinat-Synthase (ALA-S) und HO interessant.

Die ALA-S katalysiert die Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin zu δ -Aminolävulinat. ALA-S wird im Nukleus transkribiert, das Protein wird ins Cytoplasma überführt und gelangt dann zu den Mitochondrien. Dort ist das aktive Enzym in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [5]. Es gibt zwei gewebespezifische Isoformen der ALA-S, die erythroid-spezifische (ALA-S2) und die nicht-spezifische (ALA-S1), die von verschiedenen Genen codiert werden. Während die ALA-S2 im Knochenmark exprimiert wird, wird die ALA-S1 in allen übrigen Geweben exprimiert. Die ALA-Synthaseaktivität kann durch verschiedene porphyrogene Substanzen beeinflusst werden, die den Pool an freiem „regulatorischen“ Häm absenken [4, 131]. Auch oxidativer Streß führt zur ALA-Synthase Induktion [132].

Die Hämoxygenase (HO) baut Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen ab und stellt den einzigen Abbauweg des Häm dar (s. Abbildung 7.1). Inzwischen konnten drei Isoenzyme kloniert werden. HO-1 ist ein ubiquitäres Protein, identisch mit dem Hitzeschock-Protein 32 (HSP32), dessen Aktivität durch Häm mehrfach gesteigert werden kann. Die HO-1 ist aber auch durch andere Metalloporphyrine, Übergangsmetalle und durch Stressfaktoren induzierbar. Im Gegensatz dazu kommt die HO-2 vor allem im Gehirn vor und lässt sich nicht in der gleichen Weise induzieren. HO-3 hat nur eine sehr geringe Aktivität, ist aber auch in der Lage, Häm zu binden.

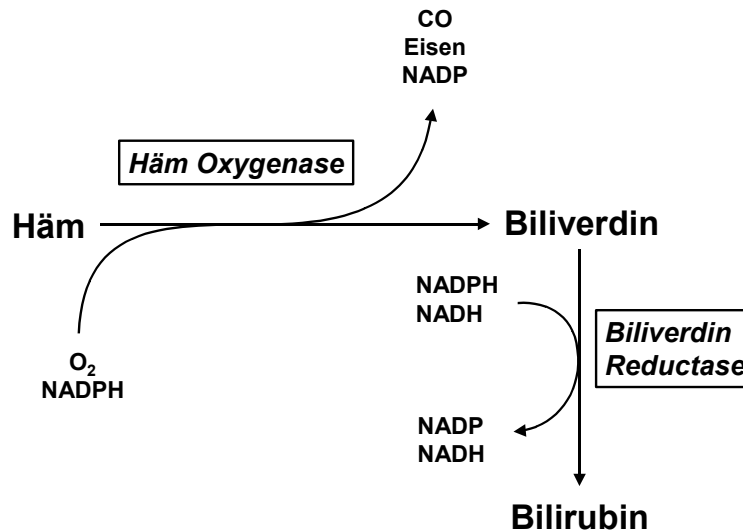


Abbildung 7.1 Enzymatischer Abbauweg des Häm (nach Immenschuh und Ramadori 2000 [133])

Die Produkte der HO-Reaktion üben wichtige Effekte im Zellstoffwechsel aus: Kohlenmonoxid ist ein wichtiger Vasodilatator, der möglicherweise für die Stressantwort des Organismus von Bedeutung ist. Biliverdin und sein Abbauprodukt Bilirubin sind wichtige Antioxidantien. Dagegen verstärkt "freies" Eisen oxidativen Stress und kontrolliert die Expression vieler mRNAs (z.B. von DCT-1, Ferritin, und des Transferrin-Rezeptors) indem es die Konformation des Iron-regulatory Proteins (IRP)-1 und dessen Bindung an Iron-regulatory-elements (IREs) in den 5'- oder 3'-UTRs verschiedener mRNAs verändert. Die HO-1 ist erheblich induzierbar nicht nur durch Häm, sondern auch durch eine Vielzahl von anderen Stressfaktoren wie UV-Licht, Schwermetalle, Lipopolysaccharide, Hitzeschock, Hyperoxie und Hypoxie [133]. Im Gegensatz zu den umfangreichen Erkenntnissen zur Induktion der HO-1 gibt es nur sehr wenige Arbeiten zur Expressionsunterdrückung des Enzyms. Das HO-1 Gen kann so in glatten Muskelzellen durch Angiotensin II herunterreguliert werden [134]. Eine HO-1 suppressive Wirkung wurde auch für Interferon $-\gamma$, Interleukin-10 und *cytokines transforming growth factor- β_1* beschrieben [133].

Die Abnahme der ALA-S könnte auf eine erhöhte intrazelluläre Hämkonzentration deuten, die reduzierte Expression der HO könnte auf eine Blockade des Hämabbaus durch die Wirkung der iNOS zurückzuführen sein. Beides sowohl die Abnahme der

ALA-S Expression und vor allem der drastische Rückgang der HO- Expression ist Gegenstand weiterer Forschungsvorhaben.

Zusammenfassend konnte eine konstante Minderexpression der Ferrochelatase in kolorektalen Karzinomen durch RT-PCR belegt werden. Auf Proteinniveau war dieser Unterschied zwar quantitativ stärker, aber bei hoher interindividueller Variabilität nicht signifikant. Eine Genchip- Expressionsanalyse aller Enzyme der Hämsynthese und des Hämatabolismus lieferte darüberhinaus weitere, z.T. sehr deutliche Expressionsunterschiede, sodass die Minderexpression der Ferrochelatase nur als ein Mosaikstein in der Kausalität der PpIX-Akkumulation in kolorektalen Tumoren anzusehen ist. Dennoch belegt der Nachweis systematischer Alterationen des Hämstoffwechsels in den untersuchten Tumorgeweben im Vergleich zum Normalgewebe die Hypothese einer Akkumulation von Protoporphyrin IX als Ursache der initial beobachteten tumorspezifischen Fluoreszenz. Die folgenden Kapitel beschreiben nun Untersuchungen zu einer unmittelbaren klinischen Nutzung dieser Protoporphyrin IX-Autoakkumulation.

8 Untersuchungen zur Tumor- und Metastasendetektion auf der Basis der endogenen Protoporphyrin IX-Akkumulation

8.1 Einführung

In den letzten zehn Jahren hat die onkologische Chirurgie in weiten Bereichen einen deutlichen Wandel erfahren. War Anfang der neunziger Jahre das Dogma der grundsätzlichen en-bloc-Resektion von Primärtumor und drainierendem Lymphabflussgebiet noch weitgehend unangetastet, so war es ganz wesentlich die Entwicklung auf dem Gebiet der Sentinel-node Detektion in der Mammakarzinom- und Melanomchirurgie, die, wenn auch immer noch Gegenstand von Kontroversen, zu einer Trendwende geführt hat und zumindest ein kritisches Hinterfragen chirurgisch-onkologischer Grundsätze auch für Tumoren des Gastrointestinaltraktes berechtigt. Im Unterschied zum Mammakarzinom besitzt die Lymphonodektomie bei kolorektalen Karzinomen jedoch auch einen unzweifelhaft kurativen Charakter, denn selbst bei Befall der Grenzlymphknoten am Stamm der Arteria mesenterica inferior kann durch alleinige Chirurgie eine Langzeitkuration erreicht werden [6, 7].

Im Sinne eines patientenindividualisierten Ausmaßes der Lymphdissektion kann eine Methode zur intraoperativen Lymphknotendiagnostik somit sowohl zu einer Reduktion wie zu einer Erweiterung des Ausmaßes der Lymphdissektion führen.

Diese Aspekte sind jedoch für das Kolon- und Rektumkarzinom jeweils unterschiedlich zu bewerten und werden von praktischen Aspekten wie zum Beispiel der intraoperativ sehr begrenzten Zugänglichkeit des Mesorektum eingeschränkt.

Ein ganz wesentlicher Aspekt kann aber in der Verbesserung des pathohistologischen Staging liegen, in dem auf Basis der Fluoreszenz eine perioperative Vorselektion von Lymphknoten für eine intensivere pathologische Aufarbeitung im Sinne eines ‚Superstaging‘ erfolgen könnte.

Für die Beurteilung der potentiellen diagnostischen Wertigkeit eines autofluoreszenzbasierten Verfahrens zur intraoperativen Metastasierungsdiagnostik war daher zunächst die Konstanz der in Kapitel 3.4 (siehe insbes. Abbildung 4.2) beobachteten Autoakkumulation von PpIX zu untersuchen und mittels diagnostischer Maßzahlen zu beschreiben. Als Gold-Standard war zunächst die konventionelle pathohistologische Aufarbeitung heranzuziehen, im Hinblick auf ein mögliches Superstaging aber auch erweiterte pathohistologische Techniken mit Serienschnittanalysen und Immunhistochemie.

8.2 Material und Methodik

8.2.1 Messapparatur

In der Pilotstudie wurde die in Kapitel 3.2 beschriebene Apparatur 1 verwendet. Für eine optimierte Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz in Tumor und Normalgewebe ebenso wie für die Querschnittuntersuchung von Geweben aus der Tumorbank wurde die im Kapitel 3.3 beschriebene 2. Generation des Fluoreszenzmessplatzes entwickelt.

8.2.2 Messgeometrie

Für die Pilotstudie wurde ein Messaufbau mit einer Anregungsfaser und einer separaten Detektionsfaser verwendet. In der zweiten Gerätekonfiguration erfolgte Fluoreszenzanregung und –detektion mit einer einzigen Faser. Reflektiertes Laserlicht und Fluoreszenzlicht wurden durch einen dichroitischen Spiegel getrennt.

Die Messmethode mit einer Faser hat wesentliche Vorteile:

Über einen begrenzten Bereich wird die Empfindlichkeit der Messung durch eine Veränderung des Abstandes zwischen Faser und Probe nur unwesentlich beeinflusst.

Die Öffnungswinkel für Anregung und Beobachtung der Fluoreszenz sind identisch. Daraus ergibt sich eine vereinfachte Handhabung bei der Einhaltung reproduzierbarer Messbedingungen.

In jedem Fall wurden die zu messenden Proben kontaktfrei mit einem Abstand von 1-2 mm unter der Messfaser gelagert. Lymphknoten wurden grundsätzlich von außen, endoluminale Tumoren und Schleimhautproben von der Lumenfläche aus vermessen. Nur wo dies nicht möglich war, z.B. bei Material aus der Tumorbank, wurde von einer Schnittfläche aus untersucht.

8.2.3 Patienten

8.2.3.1 Pilotstudie

9 Patienten (mittleres Alter 68 Jahre, 2 Frauen und 7 Männer) mit einem kolorektalen Karzinom (7 Kolon- und 2 Rektumkarzinome, 8 pT3 und 1 pT4 Kategorie) und präoperativer Evidenz eines transmuralen Tumorwachstums (uT3) wurden einem offen chirurgischen, onkologisch radikalen Eingriff unterzogen. Die Resektionspräparate wurden ohne Zeitverzug für die Fluoreszenzmessungen aufgearbeitet.

8.2.3.2 Lymphknotenvalidierungsstudie

33 Patienten mit der präoperativen Diagnose oder hochgradigen Verdachtsdiagnose eines kolorektalen Karzinoms, die sich an unserer Einrichtung einem resezierenden Eingriff unterzogen, wurden in die Studie aufgenommen. Es wurde keine Patientenselektion vorgenommen. Fünf der Patienten mit Rektumkarzinom waren durch hypertherme Radiochemotherapie vorbehandelt, drei weitere Patienten mit Rektumkarzinom hatten sich vor der Resektion einer Radiochemotherapie unterzogen. Beide Behandlungen waren unter einem unabhängigen klinischen Studienprotokoll durchgeführt worden [135]. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 8.1 wiedergegeben.

8.2.3.3 Querschnittuntersuchung Tumorbank

Hierzu wurden Tumor- und Normalgewebe von insgesamt 20 kolorektalen Karzinompatienten aus der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik im Hinblick auf die Verfügbarkeit von Gewebe sowohl des Primärtumors wie unterschiedlicher Metastasenlokalisationen selektiert.

8.2.4 Fluoreszenzuntersuchung

Die Fluoreszenzspektren von Primärtumor und umgebende Normalschleimhaut wurden unmittelbar nach Abgabe des Präparates aus dem OP gemessen. Die aufgeschnittenen Präparate wurden mit Wasser von Stuhlresten und Schleim gereinigt. Die Präparate wurden unmittelbar postoperativ von der Lumenseite her fluorimetrisch untersucht. Dabei wurden jeweils mindestens 7 Messpunkte am Primärtumor und auf der Normalschleimhaut vermessen. Die spezifische Fluoreszenzintensität R (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 24) wurde als Mittelwert dieser Messungen aufgezeichnet. In einigen Präparaten fanden sich über das invasive Karzinom hinaus adenomatöse Polypen, die ebenfalls fluorimetrisch vermessen wurden. Danach wurden alle tastbaren Knoten aus dem en-bloc-Präparat präpariert, individuell gekennzeichnet und bei Raumtemperatur während der Messung feucht gehalten. Die Zeit von 4 Stunden zwischen der Unterbrechung der Blutzufuhr und der jeweils letzten Fluoreszenzmessung wurde nicht überschritten.

Die Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}}=505\text{nm}$ war experimentell anhand eines Fluoreszenzanregungsspektrums ($\lambda_{\text{obs}}=630\text{nm}$ und $\lambda_{\text{obs}}=700\text{nm}$) ermittelt worden, da der für die spezifische Fluoreszenz verantwortliche Farbstoff zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht genau bekannt war. Von allen Proben wurden komplette Fluoreszenzemissionsspektren ohne Zeitverzögerung und mit $\Delta t=20\text{ ns}$ Zeitverzögerung aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensität bei $\lambda=595\text{ nm}$ und bei $\lambda=633\text{ nm}$ wurde direkt aus den zeitverzögerten Fluoreszenzspektren ausgelesen. Die Spektren waren korrigiert auf die spektrale Transmission des Polychromators, die spektrale Empfindlichkeit der Photokatode der intensivierten CCD-Kamera (in der Pilotstudie Diodenzeile), aber nicht auf die Transmission des Langpasses $\lambda_{50\%} = 550\text{ nm}$. Zusätzlich wurde das elektronische Rauschen des Detektors von den Rohdaten abgezogen.

8.2.5 Pathologie

Die konventionelle pathohistologische Untersuchung der Lymphknoten wurde anhand einer einzelnen äquatorialen Schnittebene jedes Lymphknotens nach Hämatoxylin&Eosin-Färbung durchgeführt.

In der Pilotstudie wurde eine Reevaluation fluoreszenz-positiver, aber konventionell pathohistologisch-negativer Lymphknoten durchgeführt. Hierfür wurden die

Lymphknoten zusätzlich in mindestens 10 H&E-gefärbten Stufenschnitten beurteilt. Zusätzlich wurde eine Vergleichsgruppe Fluoreszenz- und Routinepathologie-negativer Lymphknoten nach dem Zufallsprinzip identifiziert und analog in Stufenschnitten beurteilt.

In der Evaluationsstudie wurde eine Auswahl von Lymphknoten, die in der Routinepathologie als normal klassifiziert wurden, aber hohe Fluoreszenzraten aufwiesen, einer Serienschnittuntersuchung des gesamten Knotens unterzogen. Ein äquatorialer Schnitt wurde zudem mittels Panzytokeratin Antikörper MNF 116 (Boehringer, Mannheim) auf das Vorhandensein Panzytokeratin-positiver Zellcluster untersucht.

8.3 Ergebnisse

8.3.1 Pilotstudie Lymphknoten

8/9 Patienten wiesen eine pT3 Kategorie auf, 1 Patient wurde pT4 klassifiziert. 174 Lymphknoten wurden konventionell pathohistologisch aufgearbeitet. Nur Bindegewebe enthaltende Knoten wurden in dieser Phase nicht weiter analysiert. Einunddreißig von 174 Lymphknoten waren laut konventioneller Pathohistologie metastasenbefallen. Einer der Primärtumoren wies eine spezifische Fluoreszenz **R** <1, alle anderen wiesen **R**-Werte z.T. deutlich über 1 auf. 6/9 gemessenen **R**-Werten für die Normalschleimhaut lagen unter 1. Die **R**-Werteverteilungen für metastatische und tumorfreie Lymphknoten waren signifikant verschieden ($p < 0,05$, U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon). Abbildung 8.1 demonstriert den diskriminativen Wert dieses Fluoreszenzparameters. Bei einem Schwellenwert $R=1$ resultiert eine Spezifität von 85%, eine Sensitivität von 65%, ein positiver Vorhersagewert von 52% und ein negativer Vorhersagewert von 91%.

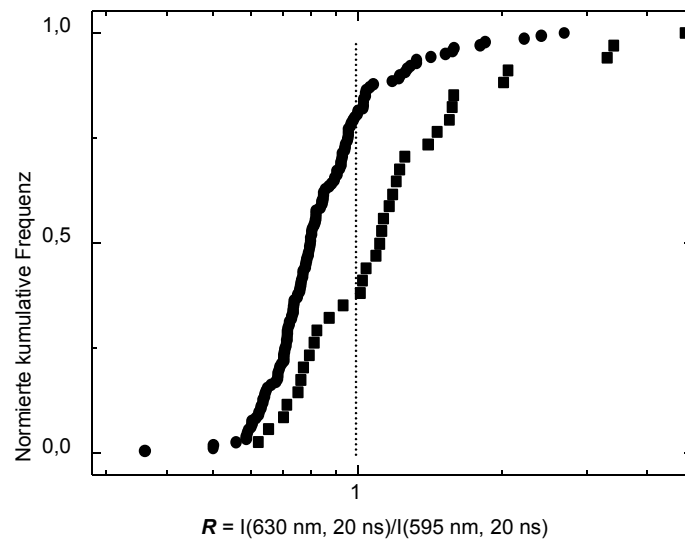


Abbildung 8.1 Normierte kumulative Frequenz für die spezifische Fluoreszenz R , Pilotstudie. Insgesamt 43 Lymphknoten wurden als fluoreszenz-positiv ($R > 1$) eingestuft, 22 von diesen waren pathologisch positiv. 131 Lymphknoten waren fluoreszenz-negativ ($R < 1$), 119 davon waren auch pathohistologisch metastasenfrei. In den initial 24 fluoreszenz-falsch-positiven Lymphknoten wurden durch Stufenschnitte 3 weitere Metastasen gefunden. In einer auf Zufallsbasis ausgewählten Vergleichsgruppe der fluoreszenz-richtig-negativen wurde keine weitere Metastase identifiziert (Abbildung 8.2).

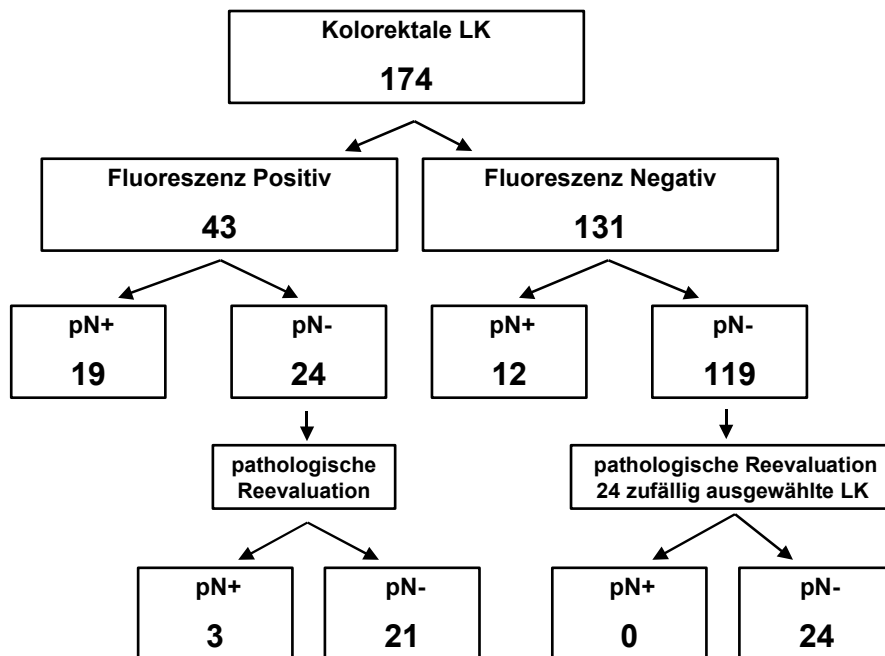


Abbildung 8.2 Der Evaluationsprozess der Lymphknoten nach der Präparation. Fluoreszenz-positiv bedeutet eine spezifische Fluoreszenz $R \geq 1,0$, Fluoreszenz negativ ist definiert als $R < 1,0$. pN+ und pN- basierten zunächst auf einer Routine-Pathologie (einzelner H&E gefärbter Equatorialschnitt). In einer fluoreszenzgeführten Reevaluation Fluoreszenz-positiver, aber Routine-pathologie-negativer Lymphknoten sowie in einer nach dem Zufallsprinzip identifizierten Vergleichsgruppe fluoreszenz- und routinopathologie-negativer Lymphknoten wurden die Lymphknoten zusätzlich in mindestens 10 H&E-gefärbten Stufenschnitten beurteilt.

8.3.2 Querschnittuntersuchung Tumorbank

Die Fluoreszenzmessungen an Geweben aus der Tumorbank ergaben für Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Lebermetastasen im Vergleich zum Normalgewebe bei erheblichen Spannweiten jeweils signifikant höhere Werte für die spezifische Fluoreszenz R (Abbildung 8.3).

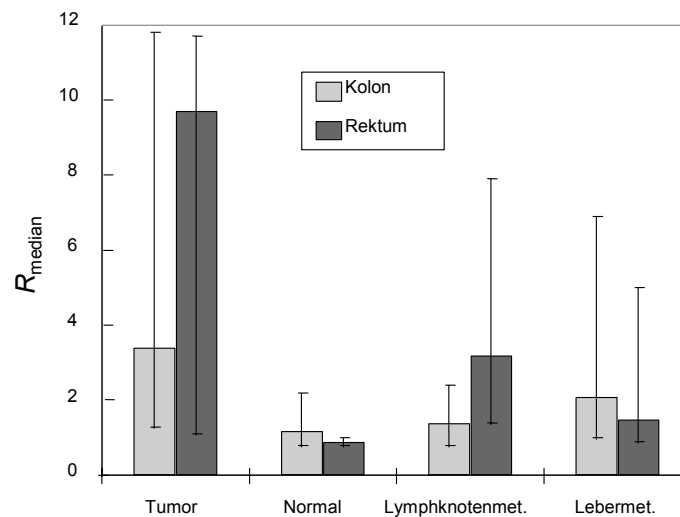


Abbildung 8.3 spezifische Fluoreszenzintensitäten R von Tumorproben aus Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Lebermetastasen und von Normalgewebe, jeweils von identischen Patienten. Angegeben sind Median und 68%-Konfidenzintervalle.

8.3.3 Validierungsstudie Lymphknoten

8.3.3.1 Patienten

Die klinischen Daten der Patienten sowie die definitiven pathologisch determinierten Tumorstadien sind in Tabelle 8.1 wiedergegeben. Ein Patient wurde unter Karzinomverdacht bei symptomatischer Sigmastenose in die Studie eingeschlossen, pathohistologisch bestand jedoch ein Adenom. Weiterhin angegeben sind die Zahlen der untersuchten „Knoten“ und der pathohistologisch angegebenen Lymphknoten (Lymphknoten). Differenzen resultieren dort, wo bei großen Lymphknoten-Zahlen durch Überschreiten der Zeitgrenzen nicht alle Knoten fluorimetrisch untersucht werden konnten sowie aus der Tatsache, dass einige der präparierten „Knoten“ im Schnitt mehrere Lymphknoten aufwiesen.

Tabelle 8.1 Patientencharakteristika und Tumorstaging für 33 untersuchte kolorektaler Operationspräparate

1) RCT: Radiochemotherapie, HRCT hypertherme Radiochemotherapie; 2) TNM n UICC [136]; ³⁾ Die Zahl der metastatischen Lymphknoten beinhaltet die in der Reevaluation positiv beurteilten Knoten. Die Zahl in Klammern geben die Anzahl der Lymphknoten im Pathologiebefund wieder, Differenzen entstehen, da nicht immer alle Knoten untersucht werden konnten. Darüber hinaus enthielten einzelne präparierte Knoten gelegentlich mehrere Lymphknoten; 4) unter Tumorverdacht bei symptomatischer Stenose reseziert; 5) 88J, Nachbestrahlung mit dem Ziel des Kontinenzverlustes; 6) N1 nach path. Reevaluation

No	Alter	Gesch	Lokalisation	neoadjuvant Therapie ¹⁾	TNM ²⁾	Grading	Chir. Radikal.	Lymphknoten für Fluoreszenzuntersuchungen ³⁾			Pathologische Reevaluation Lymphknoten	
								normale Lymphknoten	involved nodes	connective tissue	Gesamt	Davon N+
1	62	m	sigmoid	none	pT3 N2 M0	G2 L1 V0	R0	35 (40)	9 (9)	3 (3)	11	4
2	54	m	rectum	none	pT2 N1 M0	G2 L0 V0	R0	24 (24)	1 (1)	14 (14)	3	0
3	69	f	sigmoid	none	pT2 N0 M0	G2 L0 V0	R0	18 (18)	0 (0)	3 (3)	3	0
4	52	f	transverse colon	none	pT3 N0 M1	G2 L0 V0	R2 (F)	9 (11)	1 (1)	16 (16)	0	0
5	63	m	rectum	HRCT	ypT2 N0 M0	G2 L0 V0	R0	7 (7)	0 (0)	15 (15)	1	0
6	69	f	sigmoid	none	pT3 N0 M0	G2 L0 V0	R0	15 (25)	0 (0)	27 (27)	2	0
7	76	m	rectum	none	pT2 N0 M0	G2 L0 V0	R0	13 (18)	0 (0)	19 (19)	0	0
8	69	f	rectosigmoid	none	pT2 N0 M0	G2 L0 V0	R0	11 (20)	0 (0)	5 (5)	2	0
9	56	f	transverse colon	none	pT4 N3 M1	G3 L1 V0	R2 (F)	10 (19)	14 (16)	0 (0)	1	1
10	57	m	ascending colon	none	pT3 N0 M0	G1 L1 V0	R0	29 (41)	0 (0)	6 (6)	2	0
11	79	f	rectosigmoid	none	pT3 N1 M0	G1 L1 V1	R0	16 (17)	2 (2)	14 (14)	2	0
12	83	m	sigmoid	none	pT3b(m) N0 M0	G3 L0 V0	R0	5 (37)	0 (0)	4 (9)	0	0
13	70	m	sigmoid	none	pT0	adenoma ⁴⁾	-	28 (30)	0 (0)	0 (0)	0	0
14	88	m	rectum	none	pT3 N0 M0	G2 L0 V1	R1 ⁵⁾	23 (27)	0 (0)	17 (17)	0	0
15	69	m	rectum	RCT	ypT3 NX M0	G2 L0 V0	R0	5 (6)	0 (0)	23 (23)	0	0
16	65	m	rectum	none	pT3 N3 M1 (LYM)	G2 L1 V1	R2 (F)	17 (22)	21 (29)	10 (10)	0	0
17	47	m	ascending colon	none	pT3 N0 M0	G3 L0 V0	R0	31 (47)	0 (0)	19 (19)	8	0
18	57	f	rectum	HRCT	ypT3 N2 M0	G3 L1 V1	R1	14 (19)	31 (61)	12 (12)	0	0
19	80	f	rectum	none	pT3 N2 M0	G2 L0 V0	R0	20 (32)	1 (4)	9 (9)	0	0
20	55	m	rectum	HRCT	ypT3 N0 M0	G2 L1 V0	R0	20 (24)	0 (0)	11 (11)	0	0
21	67	m	rectum	RCT	ypT3 N0 M0	G2 L0 V0	R0	11 (13)	0 (0)	6 (6)	0	0
22	71	m	rectum	none	pT2 N3 M1 (HEP)	G3 L1 V0	R2 (F)	20 (20)	3 (5)	17 (17)	0	0
23	49	m	rectum	HRCT	ypT3 N0 M0	G2 L0 V0	R0	15 (20)	0 (0)	7 (7)	0	0
24	69	m	rectum	none	pT3 N2 M0	G3 L1 V1	R2 (F)	1 (3)	14 (24)	3 (3)	0	0
25	54	m	rectum	HRCT	ypT2 N2 M0	G2 L0 V0	R0	4 (9)	4 (5)	45 (45)	0	0
26	62	f	sigmoid	none	pT2 N0 M0	G2 L0 V0	R0	32 (38)	0 (0)	34 (34)	1	0
27	56	m	sigmoid	none	pT4 N3 M0	G2 L1 V1	R0	20 (20)	13 (13)	28 (28)	2	1
28	81	m	transverse colon	none	pT3 (3) N0* M0	G2 L0 V0	R0	15 (17)	2 (2)	4 (4)	10	2
29	50	m	sigmoid	none	pT3 N0 M0	G2 L0 V0	R0	12 (17)	0 (0)	2 (2)	0	0
30	59	m	rectosigmoid	none	pT4 N3 M1 (HEP)	G2 L0 V0	R2 (F)	6 (6)	6 (6)	15 (15)	0	0
31	72	m	ascending colon	none	pT3 N3 M1 (HEP)	G3 L1 V1	R2 (F)	21 (23)	0 (0)	3 (3)	2	0
32	79	f	sigmoid	none	pT4 NX M1 (OME)	G2 L0 V1	R0	3 (8)	3 (3)	0 (0)	0	0
33	72	f	rectum	RCT	ypT3 N1 M0	G2 L1 V0	R0	18 (18)	1 (1)	8 (8)	0	0

8.3.3.1 Fluoreszenzmessungen an Primärtumoren und Normalgeweben

Die normierten Fluoreszenzintensitäten R sind für die 33 untersuchten Resektate (32 Adenokarzinome und 1 Adenom) in Abbildung 8.4 wiedergegeben. Bei 31 Karzinomen wurde ein $R > 1$ (deutliches Vorliegen des Fluorophors) gefunden. In einem einzigen Fall war $R < 1$. Dieser Patient war effektiv durch hypertherme Radiochemotherapie vorbehandelt, sein Tumorstadium hatte sich von uT3 zu ypT2 zurückentwickelt. In 7 von 33 Fällen zeigte die normale Schleimhaut Fluoreszenzintensitäten von $R > 1$. In 30 von 32 Adenokarzinomen war der Kontrast zwischen Tumor und umgebender Normalschleimhaut positiv ($R_{\text{Tumor}} > R_{\text{Mukosa}}$). In einem der Fälle war der Kontrast negativ aufgrund des niedrigen Fluoreszenzsignals im Tumor, in dem zweiten Fall war zwar der Tumor hochgradig positiv ($R = 11,47$), die Fluoreszenz der Normalschleimhaut überschritt diesen Wert jedoch noch deutlich ($R = 15,5$). Bei diesem Patienten konnte keine spezielle Medikation oder Besonderheit in der Ernährung identifiziert werden, die diese atypische hohe Fluoreszenz der Normalschleimhaut erklären würde. In 7 Adenokarzinomresektaten konnten zusätzlich adenomatöse Polypen identifiziert werden. Die quantitative Fluoreszenzintensität in diesen Polypen lag in 5 von 7 Fällen zwischen den Werten des bösartigen Tumors und der Normalschleimhaut, in einem von sieben oberhalb der Tumorfluoreszenz und in einem von sieben Fällen unterhalb der Fluoreszenz der Normalschleimhaut. In dem einzelnen Fall, in dem eine Stenose auf ein Adenom zurückzuführen war, lag die spezifische Gewebeeigenfluoreszenz an der Oberfläche des Adenoms nicht wesentlich höher als die Fluoreszenz der Normalschleimhaut.

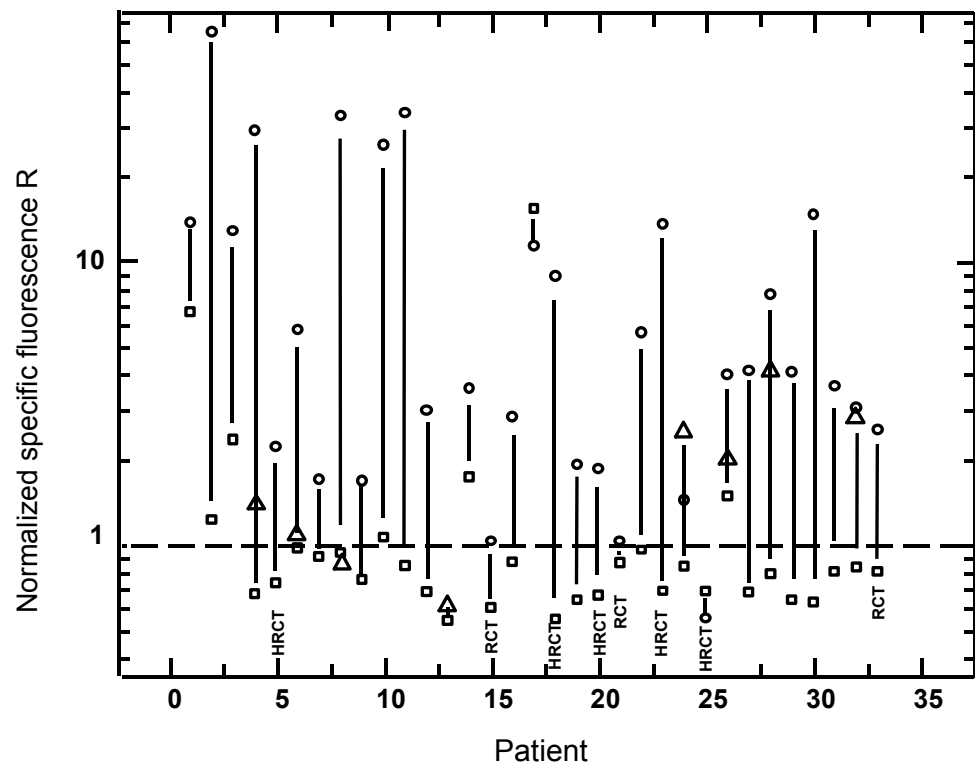


Abbildung 8.4 Fluoreszenzintensitäten in kolorektaler Schleimhaut (\square), Kolonadenomen (\triangle) und Kolonkarzinomen (\circ), dargestellt als spezifische Fluoreszenzintensität. Patienten nach neoadjuvanter Behandlung sind gekennzeichnet (HRCT: Hypertherme Radiochemotherapie, RCT: Radiochemotherapie).

8.3.4 Fluoreszenzmessungen an mesenterialen palpablen Verdichtungen

Die Gesamtzahl der untersuchten Präparate ist in Tabelle 8.2 zusammengefasst. Insgesamt wurden 1053 präparierte Knoten untersucht.

Tabelle 8.2 Gesamtzahlen aufgrund des Palpationsbefundes untersuchter Lymphknoten sowie pathohistologisch identifizierter Lymphknoten (letzter Wert in Klammern; * enthält Patient mit Adenom, ** enthält Lymphknoten die erst bei Reevaluation als metastatisch identifiziert wurden)

	Patienten- zahl	Palp. Knoten	Lymphknoten		Bindegewebs- knoten
			tumorfrei	metastatisch	
Ohne Vorthherapie	25*	796 (974)	434 (582)	90** (115)	272 (277)
Nach RCT/HRCT	8	257 (310)	94 (116)	36 (67)	127 (127)
Gesamt	33	1053 (1284)	528 (698)	126 (182)	399 (404)

Da die Vorbehandlung, die ein Patient erfahren hat, einen erheblichen Einfluß auf die spezifische Gewebeeigenfluoreszenz zu haben scheint, zeigen wir zunächst die Verteilung des Parameters R für die spezifische Gewebeeigenfluoreszenz für 796 palpable Knoten von 25 Resektaten von Patienten ohne Vorbehandlung.

Tumorbefallene Lymphknoten zeigten eine breitere Verteilung der R -Werte mit einer Verschiebung hin zu den höheren spezifischen Fluoreszenzwerten ($R_{\text{median}} = 1.11$) im Vergleich zu den nicht-tumorbefallenen Lymphknoten ($R_{\text{median}} = 0.82$) und den Bindegewebsknoten ($R_{\text{median}} = 0.73$). Alle Werteverteilungen überlappen. Die Überlappung ist am größten zwischen den bindegewebigen Knoten und den nicht-tumorbefallenen Lymphknoten

Die Verteilungen sind mit einem $p < 0,001$ verschieden (Mann-Whitney U-test).

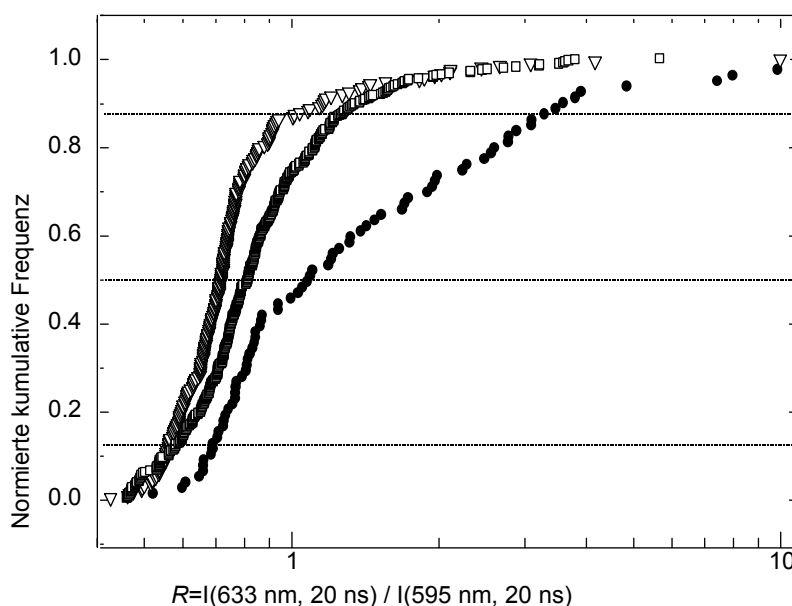


Abbildung 8.5 Logarithmische Darstellung der normierten kumulativen Häufigkeit von spezifischen Fluoreszenzintensitäten R für 796 tastbare Knoten von 25 Patienten mit kolorektalem Karzinom unter Ausschluss der vorbehandelten Fälle (tumorfreie Lymphknoten (□, $n=434$); Bindegewebsknoten (▽, $n=272$); metastatische Lymphknoten (●, $n=90$))

Wenn wie in den vorangegangenen Arbeiten ein diskriminativer Wert $R = 1$ gewählt wird, resultiert eine Sensitivität von 62 % bei einer Spezifität von 78 % für die Erkennung von Lymphknoten-Metastasen am Gesamtpool der Lymphknoten. Die Ergebnisse der Pilotstudie an einer kleinen Anzahl von Lymphknoten wurden im Wesentlichen bestätigt (s Tabelle 8.3).

Tabelle 8.3 Diagnostische Wertigkeit der spezifischen Autofluoreszenzdetektion auf der Basis eines diskriminativen $R = 1$. Die Ergebnisse der Pilotstudie sind zum Vergleich angegeben. Bei der Pilotstudie waren nur histologisch bestätigte Lymphknoten (Lkn.) in die Analyse eingegangen

	Pilotstudie	Validierungsstudie	
	Lkn.	Alle 'Knoten'	Lkn.
Proben	171	796	524
Sensitivität	65%	62%	62%
Spezifität	85%	78%	75%
Positiver Vorhersagewert	51%	28%	34%
Negativer Vorhersagewert	91%	94%	90%

Die Abbildung 8.6 vergleicht die Verteilung der Parameter Lymphknotengröße (Volumen, berechnet aus 2 Durchmessern) in ähnlicher Weise wie in Abbildung 8.5. Auch hier besteht eine Differenz zwischen den Verteilungen der tumorbefallenen Lymphknoten ($V_{\text{median}} = 0.26 \text{ cm}^3$, 68%-interval: $0.04 \text{ cm}^3 - 0.95 \text{ cm}^3$) gegenüber den nicht-tumorbefallenen ($V_{\text{median}} = 0.14 \text{ cm}^3$, 68%-interval: $0.02 \text{ cm}^3 - 0.29 \text{ cm}^3$). Die Diskrimination durch Volumen ist jedoch schlechter als die durch Autofluoreszenz. Die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität mit dem Parameter Volumen beträgt 120% verglichen mit 140% für eine Diskrimination auf Basis des Parameters spezifische Fluoreszenz. Abbildung 8.7 belegt die Unabhängigkeit beider Größen.

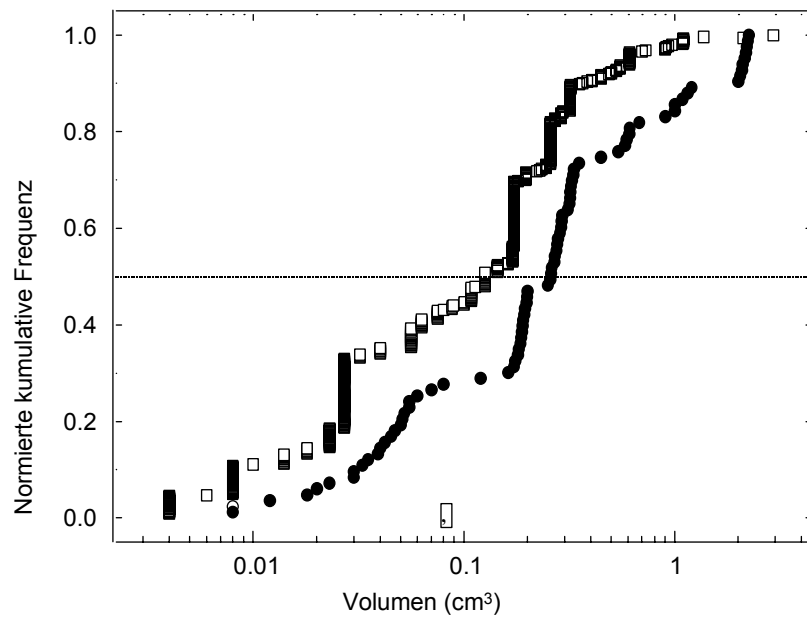


Abbildung 8.6 Logarithmische Darstellung der normierten kumulativen Häufigkeit von spezifischen Fluoreszenzintensitäten R für 796 tastbare Knoten von 25 Patienten mit kolorektalem Karzinom unter Ausschluß der vorbehandelten Fälle (tumorfreie Lymphknoten (□, n=434); metastatische Lymphknoten (●, n=90))

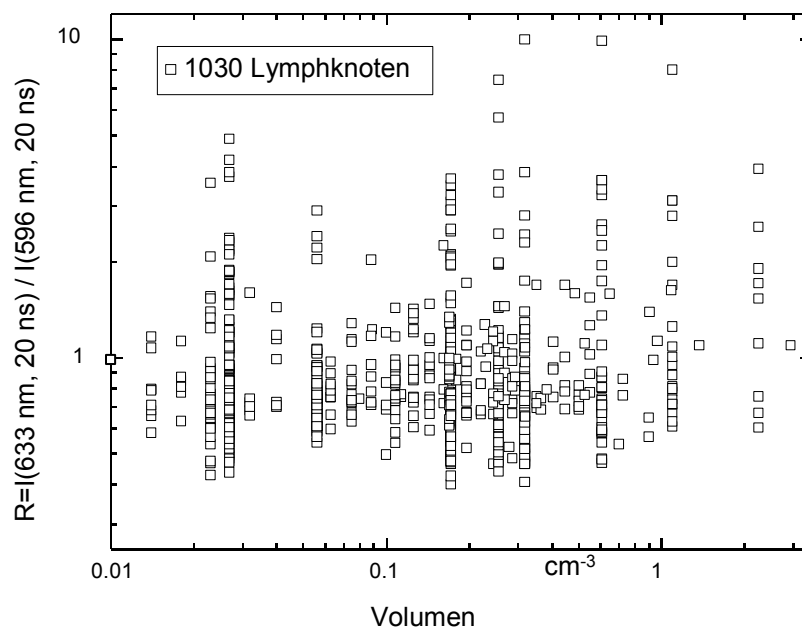


Abbildung 8.7 Verteilung Spezifische Fluoreszenz versus Volumen für 1030 Lymphknoten der Validierungsstudie

Eine erheblich niedrigere Sensitivität von 41 % bei einer Spezifität von 82 % erhält man dagegen, wenn die vorbehandelten Fälle, deren normierte kumulative Häufigkeiten in Abbildung 8.8 dargestellt sind, miteinbezogen werden. Hier scheint der im nicht vorbehandelten Kollektiv deutlich diskriminierende Effekt der spezifischen Fluoreszenz aufgehoben zu sein.

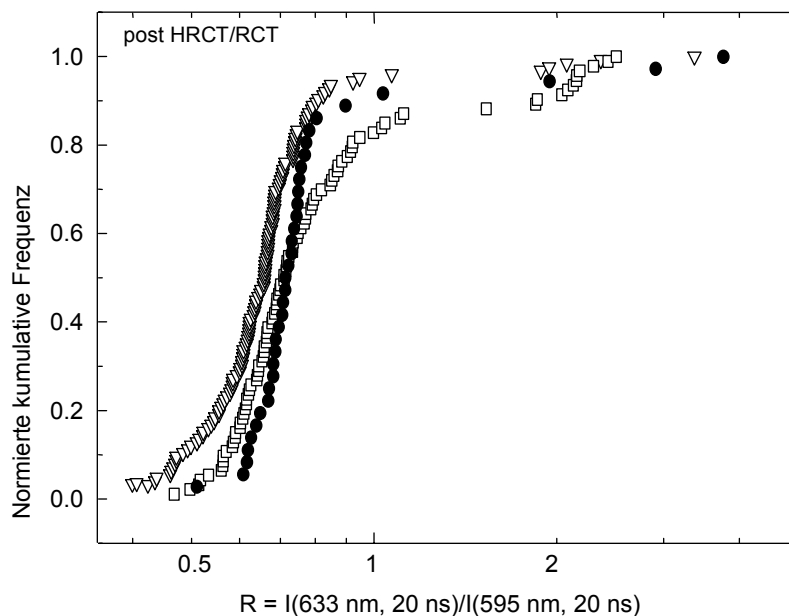


Abbildung 8.8 Logarithmische Darstellung der normierten kumulativen Häufigkeit von spezifischen Fluoreszenzintensitäten R für 257 tastbare Knoten von 25 Patienten mit kolorektalem Karzinom unter Ausschluss der vorbehandelten Fälle (tumorfreie Lymphknoten (□, n=94); Bindegewebeknoten (▽, n=127); metastatische Lymphknoten (●, n=36))

Im Hinblick auf einen klinischen Einsatz im Sinne einer fluoreszenzgeführten Lymphknotenbiopsie ist eine fallweise Analyse anzuwenden. Wie am Beispiel des Patienten Nr. 16 aufgezeigt, ist die Überlappung der Fluoreszenzergebnisse zwischen metastatisch befallenen und normalen Lymphknoten im Bereich des Wertes $R = 1$ weniger relevant, solange die höchsten Fluoreszenzwerte der spezifischen Gewebeeigenfluoreszenz von befallenen Lymphknoten stammen.

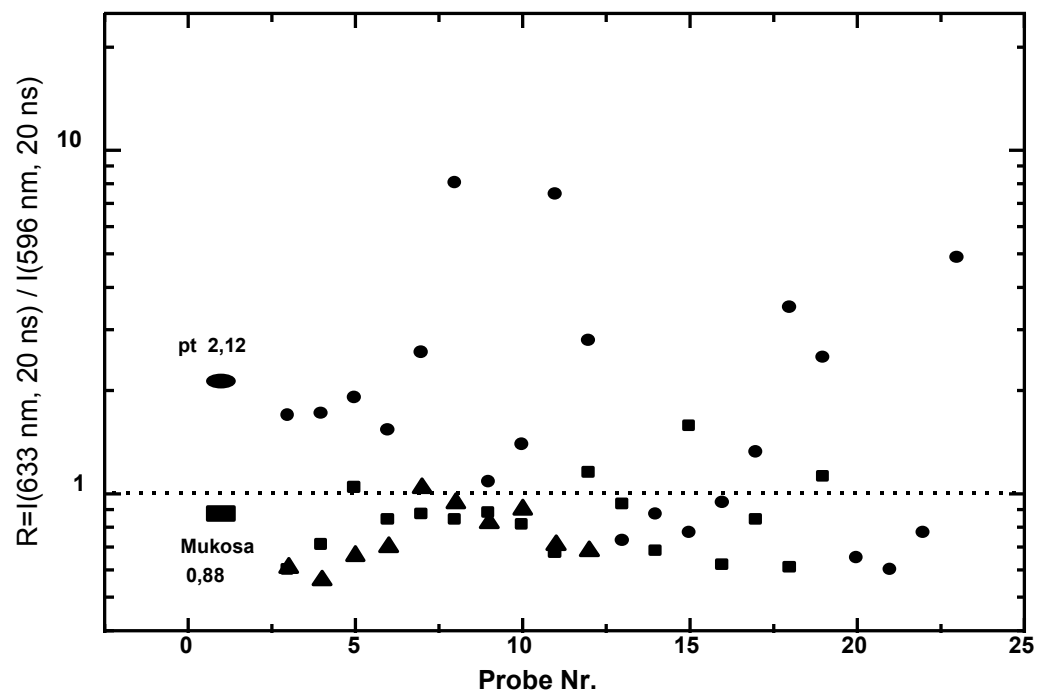


Abbildung 8.9 Verteilung der spezifischen Fluoreszenzintensitäten R in Patient Nummer 16 (■: normale Lymphknoten ($n=17$); ▲: knotige Bindegewebsverdichtungen ($n=10$); ●: metastatisch befallene Lymphknoten ($n=21$). Die Probennummer spiegelt - soweit als möglich - die Distanz der Probe vom Primärtumor wider.

In diesem Fall würde die Entnahme des Lymphknoten mit der höchsten Fluoreszenz den korrekten Lymphknotenstatus des Patienten widerspiegeln. Analysiert man alle Patienten in dieser Form, können natürlich nur für die Patienten mit positivem Lymphknotenbefall sinnvolle Ergebnisse resultieren, da jede histologische Probe eines Lymphknoten bei einem nodal negativen Patienten dessen Lymphknotenstatus korrekt vorhersagen würde. Von den 14 Patienten mit Lymphknotenmetastasen würde die Histologie eines einzelnen Lymphknoten mit dem jeweils höchsten Fluoreszenzsignal den Nodalstatus in 11 Patienten korrekt vorhersagen. Die Untersuchung von 2 Lymphknoten pro Patient würde ein korrektes Ergebnis bei 13 von 14 Patienten erzielen (Tabelle 2).

Tabelle 8.4 Prädiktion des Nodalstatus unter Annahme einer fluoreszenzgeführten Biopsie

	1 Lymphknoten biopsiert	2 Lymphknoten biopsiert
Richtig Positiv	11	13
Falsch Negativ	3	1

Eine pathologische Reevaluation wurde bei 52 Lymphknoten von 10 Patienten durchgeführt, die pathohistologisch aufgrund der Routineanalyse als normal eingestuft wurden, jedoch auffällig hohe Messwerte für die spezifische Gewebeeigenfluoreszenz aufwiesen. Acht dieser 52 reevaluierten Lymphknoten mussten aufgrund der Stufenschnitte als metastatisch eingestuft werden. Ein Patient wurde aufgrund dieser Untersuchung von nodal negativ zu nodal positiv umklassifiziert (Pat. Nr. 28). In diesem Fall zeigten die positiven Lymphknoten einen R -Wert von 2 (Abbildung 9), wiesen in der reevaluierten Gruppe aber nicht die höchste Fluoreszenz auf.

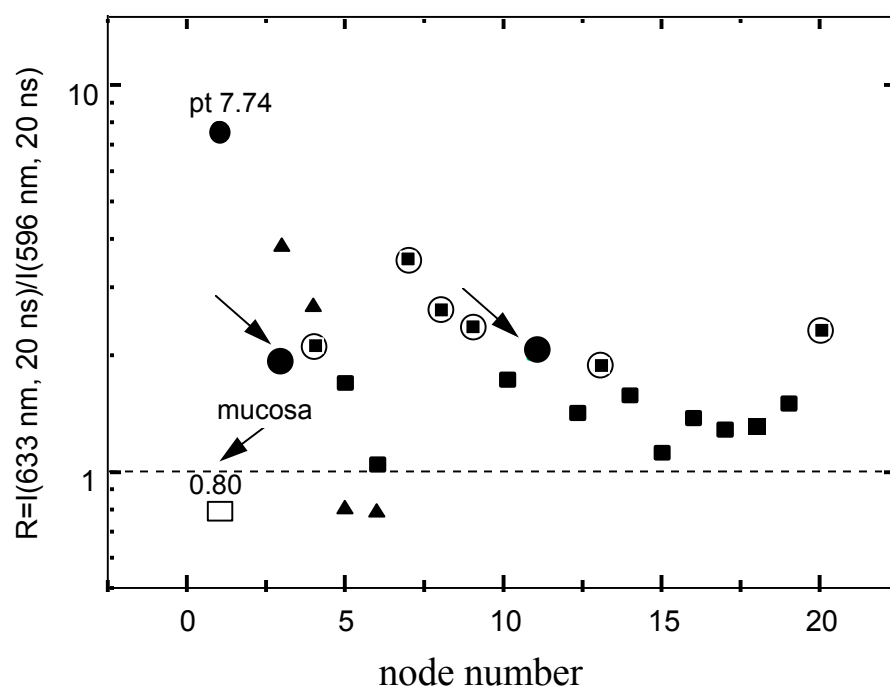


Abbildung 8.10: Verteilung der spezifischen Fluoreszenzintensitäten R in Patient Nummer 28 (■ : normale Lymphknoten ($n=16$), 6 davon sind normal auch nach pathologischer Reevaluation (eingekreist); ▲ : knotige Bindegewebsverdichtungen ($n=4$); ● : ursprünglich durch die Routinepathologie als unbefallen eingestufte, nach pathologischer Reevaluation aufgrund einer hohen Fluoreszenzintensität (R -Wert) als metastatisch befallen klassifizierte Lymphknoten ($n=2$). Die Probennummer spiegelt - soweit als möglich - die Distanz der Probe vom Primärtumor wider.

8.4 Diskussion

Beide Lymphknotenstudien ergaben hochsignifikant höhere PpIX-Fluoreszenzintensitäten für metastatisch befallene im Vergleich mit unbefallenen Lymphknoten, ein Ergebnis, das weiter die Hypothese einer tumorspezifischen Akkumulation des PpIX untermauert. Die in ex-vivo-Messungen resultierende

Sensitivität von 58% bei einer Spezifität von 78% am Gesamtpool aller untersuchter Lymphknoten belegt jedoch eine deutliche Überlappung der jeweiligen Werteverteilungen. Hinsichtlich aller zu diskutierenden klinischen Zielsetzungen ist jedoch die intraindividuelle Variabilität entscheidend. Hier ergibt sich aus der Untersuchung allein des Lymphknotens mit der intraindividuell höchsten Autofluoreszenzintensität die in Tabelle 8.4 gezeigte, korrekte Prädiktion des Nodalstatus in 29 von 32 (10/13 pN+) Fällen bei Untersuchung eines sowie in 31/32 Fällen bei Untersuchung von 2 Lymphknoten.

8.4.1 Intraoperative Ausbreitungsdiagnostik für ein individualisiertes Dissektionsausmaß

Bei kolorektalen Karzinomen ist eine regionäre Lymphknotenmetastasierung nicht gleichzusetzen mit einer systemischen Ausbreitung der Erkrankung. Die chirurgische Entfernung befallener Lymphknoten leistet somit einen eigenständigen Beitrag zur Heilung des Patienten [6, 7, 137]. Will man aufgrund eines intraoperativen Diagnoseverfahrens das Ausmaß der Lymphdissektion reduzieren, setzt dies eine hohe Sensitivität des Verfahrens voraus. Zu einer solchen Überlegung berechtigt eventuell eine von *Rouffet* mitgeteilte prospektiv randomisierte Studie an insgesamt 260 auswertbaren Patienten, die eine systematische Hemikolektomie links gegen eine segmentale Kolonresektion verglich und bei gleichem Langzeitüberleben eine zwar in Anbetracht der Fallzahl nicht signifikant, aber doch deutlich verschiedene Morbidität und Mortalität zeigte [138]. Obwohl laparoskopische Operationsverfahren grundsätzlich dasselbe Radikalitätsausmaß bieten können wie der Standardansatz [139, 140, 141], ist hier unter der Vorstellung einer intra- oder präoperativen präzisen lymphnodalen Diagnostik durchaus eine längerfristige Änderung des chirurgischen Vorgehens hin zu einem patientenindividualisierten Resektionsausmaß vorstellbar. Allerdings bedarf es hierfür einer weiteren methodischen Entwicklung, um die Ergebnisse einer punktuellen ex-vivo-Messung auf die intraoperative Situation übertragen zu können. Diese ist Gegenstand weiterer Forschungsvorhaben.

Bezüglich einer Erweiterung der Lymphonodektomie muss die Sinnhaftigkeit einer intraoperativen Diagnostik anders diskutiert werden. Eine im Vergleich zu den in Europa üblichen Standards diskutierte Erweiterung stellt zum Beispiel die

sogenannte „laterale Lymphonodektomie“ beim Rektumkarzinom dar. So berichten *Hida et al.* 1997 von einer 5-Jahres-Überlebensrate von 25 % bei Rektumkarzinompatienten mit Lymphknotenbefall in den „lateralen“ Lymphknoten. Geht man von einem grundsätzlich alleinigen chirurgischen Vorgehen aus, und in dieser Arbeit von Hida findet sich keinerlei Verweis auf eine adjuvante Therapie, so wären diese 25 % der Patienten wohl ohne die erweiterte Lymphonodektomie nicht geheilt worden. Auf der anderen Seite wiesen nur 11 % der 198 durch laterale Lymphknotendisektion behandelten Patienten solche Metastasen auf. Hieraus errechnet sich eine Gesamtzahl von 5,5 Patienten, die aufgrund einer bei 198 Patienten durchgeführten systematischen lateralen Lymphdissektion einen Überlebensvorteil hatten. Weiterhin gibt Hida für das Gesamtkollektiv der erweitert lymphonodektomierten Patienten eine Rate von 67,5 % von Blasenfunktionsstörungen und eine Rate von 97,4 % sexueller Disfunktionen bei 38 Männern an, die zum Zeitpunkt der Operation jünger als 60 Jahre waren. Hier ist das Verhältnis von Überlebensgewinn zu Nebenwirkungen der chirurgischen Therapie sicherlich ungünstig [142]. Auch *Ueno* publizierte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 35 % bei Patienten mit Befall der lateralen Lymphknoten, was in seiner Serie von 70 Patienten bei 24 % der Patienten zu verzeichnen war [143]. Bemerkenswert ist, dass alle diese Arbeiten einen Großteil von Patienten mit ausgesprochen ungünstigen Selektionskriterien zusammenfassen (37 % Analkanalinfiltration, 14 % T4-Karzinome), alles Patienten, die nach europäischem und US-amerikanischen Verständnis einer multimodalen Therapie bedürften. *Moriya* berichtet 1997 über 448 Patienten nach erweiterter Lymphonodektomie. Er beschreibt 14% Befall lateraler Lymphknoten im Gesamtpatientengut und 27 % lateraler Ausbreitung bei Dukes C-Patienten. Weiterhin beschreibt er 43 % Überleben bei Befall der lateralen Lymphknoten [144]. Unter Durchführung einer die autonomen Nerven erhaltenden Dissektionstechnik resultiert dennoch eine Lokalrezidivrate von 9,3 % insgesamt und von 16 % bei Patienten im Stadium Dukes C. Obwohl er die Technik des Erhalts des Plexus hypogastricus, die sich als Reaktion auf die initial mitgeteilten hohen Morbiditäten für Blasenentleerungsstörungen und Impotenz in Japan entwickelt hat, detailliert beschreibt, macht er keine Angaben über die Morbidität, beschreibt jedoch eine

erhebliche Verlängerung der Operationszeit von im Mittel 280 auf 371 Minuten sowie einen um 500 ml höheren durchschnittlichen Blutverlust (von im Mittel 830 ml auf im Mittel 1335 ml). In seiner Arbeit sind 26 T4-Karzinome eingeschlossen, von denen 6 einen Befall der lateralen Lymphknoten aufwiesen. Von den 294 T3-Karzinomen wiesen insgesamt 16,7 % einen Befall der lateralen Lymphknoten auf [144].

Ganz bemerkenswert ist, dass auch in sieben von 128 T2-Karzinom-Patienten eine solche laterale Lymphknotenmetastasierung vorlag sowie in 10 Fällen eine ausschließliche laterale Lymphknotenmetastasierung diagnostiziert wurde. Dies steht im Widerspruch zu den Vorstellungen der strengen Organzugehörigkeit des Lymphabfluss-Systemes, die *Stelzner* auch in seiner aktuellen Monographie [31] formuliert. Unverständlich scheint in diesem Zusammenhang auch, warum in dieser Situation die totale Mesorektumresektion, die die lateralen Lymphknoten in situ belässt, eine Lokalrezidivrate von 3 % (n=405) [145] erreichen kann. Diese Kontroverse ist bislang nicht geklärt. Festzustehen scheint aber, dass sich Überleben und Lokalrezidivfreiheit durch eine - vorsichtig formuliert – adäquate Lymphonodektomie im kleinen Becken verbessern lassen. So vergleicht eine Arbeit von *Hawenga* die chirurgischen Ergebnisse erweiterter Lymphonodektomieverfahren, wobei er interessanterweise die totale Mesorektumexzision und die japanische D3-Lymphonodektomie gemeinsam analysiert mit sogenannten konventionell chirurgisch operierten Patienten, indem er chirurgische Ergebnisse des Memorial Sloan Cattering Cancer Center (TME, n=254) des North Hampshire Hospitals, UK (TME, n=204) des National Cancer Center Tokyo (D3-Lymphonodektomie, n=233) den Ergebnissen norwegischer Krankenhäuser (konventionell, n=366) und Hospitälern des „Comprehensive Cancer Center West“ der Niederlande (konventionell, n=354) gegenüberstellt. Er konstatiert eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von 30 % und eine Senkung der Lokalrezidivrate von 25 % und folgert, dass diese erheblichen Differenzen nicht auf das nichtrandomisierte Studiendesign zurückzuführen sein können. Diesen offensichtlich chirurgischen Meriten stehen jedoch, wie für den japanischen Ansatz bereits erwähnt, erhebliche Nebenwirkungen gegenüber. Auch mit der Entwicklung der sogenannten nervenschonenden

Dissektionsverfahren in Japan klagten in einer spezifisch auf die Morbidität gerichteten Untersuchung von *Ike [146]*, noch 33 % der Patienten mit präoperativ normaler Sexualfunktion über Ejakulationsunfähigkeit nach dem Eingriff. Selbst für die TME, bei der das Nebenwirkungsprofil durch den prinzipiellen Erhalt der pelvinen Faszien und damit der autonomen Innervation nicht so vordergründig diskutiert war, werden von *Carlsen [147]* eine diskrete Erhöhung der Mortalität (nicht signifikant), eine deutliche Erhöhung der Rate von Anastomoseninsuffizienzen (von 8 % auf 16 %), die nach TME auch grundsätzlich einer operativen Revision bedurften, sowie eine längere Krankenhausliegedauer berichtet.

Vor dem Hintergrund dieser offenen Kontroverse über die Bedeutung der lateralen Lymphknotenmetastasierung mag die Verfügbarkeit eines methodisch problemlosen, da nicht radioisotopenbasierten Detektionsverfahrens für Lymphknotenmetastasen interessant erscheinen. Die Anwendungsmöglichkeit des Verfahrens wird jedoch durch die in unserer Vorgehensweise grundsätzliche Indikation zur radiochemotherapeutischen Vorbehandlung von uT3- und erst recht uT4-Karzinomen und die Beobachtung, dass nach dieser Vorbehandlung die diskriminative Information des Protoporphyrin IX-Signals verloren geht, eingeschränkt. Bezieht man sich auf die von *Moriya [144]* mitgeteilte Rate von 5,5 % Befall lateraler Lymphknoten bei T2-Karzinomen, berücksichtigt man weiterhin die Indikation zu einer adjuvanten Chemotherapie bei Primärtumoren der T3/T4 Kategorie, so ergibt sich aus der Detektion lateraler Lymphknotenmetastasen ein Nutzen nur für eine geringe Anzahl von Patienten, sodass sich die Einführung dieses Verfahrens in die klinische Routine für das Rektumkarzinom unter dem Aspekt der intraoperativen Indikation zu einem erweiterten Dissektionsverfahren nicht lohnt. Dies mag dort anders sein, wo bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen adjuvanten Therapieverfahren der Vorzug gegeben wird.

Für Karzinome des Kolon stellt sich die Situation schon aufgrund der besseren Erreichbarkeit der entsprechenden Lymphknotenstationen möglicherweise anders dar. Zunächst ist auch hier festzustellen, dass die heute gültigen Standards für die chirurgische Therapie des primären Kolonkarzinoms [148, 149] eine

systematische, anatomiegerechte Lymphonodektomie als historisch gewachsenes chirurgisches Prinzip [150] beinhalten. Die Relevanz wurde von der ‚Studiengruppe Kolorektales Karzinom‘ exemplarisch herausgearbeitet [151]. In Anbetracht der Rezidivmuster nach Kolonkarzinomresektionen [152, 153] wurde über mögliche Erweiterungen der chirurgischen Radikalität spekuliert. *Uyama* kommuniziert 1996 die Durchführung einer erweiterten Lymphonodektomie retropankreatisch bis an die Basis der Arteria mesenterica superior [44]. *Tagliacozzo* berichtet 1997 über einen retrospektiven Vergleich zwischen 60 Patienten mit einer mesenterial erweiterten Lymphonodektomie bei der Hemikolektomie rechts gegenüber 84 Patienten mit klassischem Resektionsausmaß [43]. Obwohl er keine statistisch signifikante Differenz der 5-Jahres-Überlebensraten zeigen kann, berichtet er in der erweitert lymphonodektomierten Gruppe über Langzeitüberleben bei 3 von 9 Patienten, die Lymphknotenmetastasen in dem erweitert dissezierten Kompartiment (N4) aufwiesen. Diese Arbeit wird in einem eingeladenen Kommentar von *Wixner* und *Nogueras* jedoch sehr kritisch bewertet [154]. Hier muss man sich jedoch vor Augen halten, dass eine solche kritische Bewertung die systematische Erweiterung der Lymphonodektomie betrifft, da hier das Verhältnis von zusätzlicher Morbidität zu der relativ kleinen Anzahl profitierender Patienten gering ist. Dieser Nachteil könnte jedoch durch ein individualisiert erweitertes Vorgehen, z.B. aufgrund intraoperativer diagnostischer Befunde ausgeglichen werden.

8.4.2 Pathologische Lymphknotenmetastasendetektion

Die Anzahl der für eine pathologische Untersuchung zur Verfügung stehenden Lymphknoten bedingt die Genauigkeit des pathologischen Staging [155]. Daher definiert die UICC eine Mindestanzahl von Lymphknoten, die für ein akkurates Nodalstaging Voraussetzung sind. Diese Mindestanzahlen werden in Zentren jedoch in der Regel weit überschritten. Darüber hinaus sind sog. Fett-Clearing-Techniken beschrieben, mit denen das mesenteriale Fett gelöst werden kann, wodurch sich die Zahl der detektierten bzw. detektierbaren Lymphknoten um einen Faktor 2 bis 3 steigern lässt. In einer japanischen Studie an 322 kolorektalen Resektionspräparaten und einer Gesamtzahl von 24600 durch Fett-Clearing identifizierter Lymphknoten wurde ein Upstaging für Kolonkarzinome von 42 % N+

auf 62 % N+, sowie bei Rektumkarzinomen von 50 % N+ auf 57 % N+ erreicht. [49]. Dies entspricht aber auch einem Mittel von 76 zu untersuchenden Lymphknoten pro Patient.

Kotanagi beschrieb 1993 den Zusammenhang zwischen Lymphknotengröße und Tumorbefall unter Zuhilfenahme der Clearing-Methode an 1046 Lymphknoten von 46 Patienten. Dabei erwiesen sich 50 % aller metastatisch befallenen Lymphknoten als im Durchmesser < 5mm. Von allen 651 Lymphknoten mit einem Durchmesser < 5 mm waren allerdings nur 9 % metastatisch befallen [156]. *Scott* beschrieb 1994 das Upstaging von fünf von 103 Patienten durch die Fett-Clearing-Methode vom Stadium Dukes B in Dukes C. Durch dieses Upstaging verbesserte sich das mediane Überleben der Dukes B-Gruppe von 24 auf 29 Monate (Stage-Migration, Will Rogers-Phänomen [48, 157, 158]), das der Dukes C.-Gruppe ging jedoch von 18 Monate auf 17 Monate zurück, was dafür spricht, dass die Patienten mit dem nach Clearing-Methode definierten Dukes C-Stadium keine bessere Prognose hatten als die nach konservativer Diagnostik diagnostizierten Patienten [159]. *Koren und Mitarbeiter* publizierten 1997 eine vereinfachte Methode des Lymph-Clearing [160], die zur weiteren Durchsetzung der Methode führen könnte. Dennoch entwickeln etwa 20 – 30 % von Dukes B-Patienten auch nach durch Fett-Clearing verbesserter histopathologischer Diagnostik Tumorrezidive. Eine mögliche Erklärung mag darin liegen, dass die konventionelle pathologische Untersuchung unter Zuhilfenahme eines einzelnen äquatorialen Schnittes durch den Lymphknoten für die Erkennung einer frühen lymphatischen Metastasierung inadäquat ist. *Gustersson* beschrieb 1992 eine Rate von 20 % durch Serienschnittanalyse detektierbare Mikrometastasen in konventionell pathologisch negativen Lymphknoten [161]. Darüber hinaus lässt sich ein weiterer Anteil auch in Serienschnitten als negativ beurteilter Lymphknoten durch immunhistochemische Cytokeratin (CK)-Färbungen (typischerweise werden Panzytokeratin-Antikörper verwendet, z.B. anti-keratin AE1/AE3, Boehringer Mannheim) als mikrometastasenbefallen klassifizieren. Über die prognostische Signifikanz dieser Ergebnisse besteht noch keine Einigkeit. So erkannte *Greenson et al.* 1994 in 14 von 50 Dukes B-Fällen cytotkeratin-positive Zellverbände. Zwischen cytotkeratin-positiven und cytotkeratin-negativen Patienten bestand ein signifikanter

Unterschied im 5-Jahres-Überleben (97 % bei Cytokeratin-negativ gegenüber 64 % bei Cytokeratin-positiv) [162]. Demgegenüber beschrieben *Jeffers et al.* in einer ähnlichen Untersuchung bei annähernd gleicher Inzidenz von Cytokeratin-Positivität bei Dukes B-Patienten zwar ebenfalls einen gewissen Unterschied im 5-Jahres-Überleben, aber ein identisches 10-Jahres-Überleben von 47 % in beiden Gruppen [51]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch eine Studie von *Haboubi et al.* 1992, der CK-Färbung und Fett-Clearing kombiniert und dabei zunächst durch die Cytokeratin-Färbung von 22 Dukes-B-Patienten acht in das Stadium Dukes-C klassifiziert, durch zusätzliches Fett-Clearing von den verbleibenden 14 Dukes B-Patienten weitere 14 ins Stadium Dukes C einbringt, sodass gegenüber den 22 Dukes B- und 16 Dukes C-Patienten mit konventioneller histologischer Diagnostik letztendlich 10 Dukes B-Patienten gegen 28 Dukes C-Patienten unter Ausschöpfung aller immunhistochemischer und chemischer Methoden verbleiben [163]. Ebenfalls bemerkenswert ist, dass die Anzahl der positiven Lymphknoten unter konventioneller Immunhistochemie von 25 auf insgesamt 205 positive Lymphknoten unter Cytokeratin- und Fett-Clearing-Methode anstieg. Was hieraus leicht ersichtlich wird, ist, dass beide Methoden zusammengenommen zwar eine Präzisierung der pathologischen Diagnostik erreichen, in jedem Fall aber auch eine drastische Vervielfachung des Arbeitsaufwandes resultiert. Dieser Arbeitsaufwand wird durch die Einführung von PCR-Techniken noch weiter gesteigert [164, 165, 166, 167].

Unter diesem Aspekt kann es durchaus sinnvoll sein, durch arbeitstechnisch einfache diagnostische Methoden, wie es die Fluoreszenzdetektion nach entsprechender methodischer Entwicklung sein könnte, die Lymphknoten mit der höchsten Metastasierungswahrscheinlichkeit zu identifizieren. In den von uns aufgrund des Fluoreszenzbefundes immunhistochemisch und durch Serienschnittanalyse nachuntersuchten Lymphknoten fanden wir jedoch lediglich in 15% der Lymphknoten einen metastatischen Befall. In der Pilotstudie hatten wir hierzu eine Vergleichsgruppe aus den Fluoreszenz-negativen Lymphknoten analysiert, in der diese Rate niedriger schien. In der Validierungsstudie hatten wir bei einer Rate von 15% auf einen solchen Vergleich verzichtet. Dennoch ist dieser Aspekt der Präselektion für ein sogenanntes pathologisches Superstaging, das

auf dem Gebiet der ‚Sentinel Node‘-Lymphknotendetektion beim Mammakarzinom gerade in aktiver Diskussion ist, sicher auch für eine solche Methode nicht zu vernachlässigen.

9 Zusammenhang zwischen Tiefe einer Fluorophor-akkumulation im Gewebe und Signalintensität

9.1 Einführung

Im Gegensatz zu fluoreszenzdiagnostischen Verfahren an Epitheloberflächen stellen mögliche chirurgische Anwendungen Anforderungen im Hinblick auf die Erkennung spezifischer Fluoreszenz in einer gewissen Gewebetiefe. Lymphknotenmetastasen mögen nur einen kleinen Anteil des Lymphknotens betreffen, wobei dieser in mesenterialem Fett eingebettet ist. Bei der Quantifizierung von fluoreszierenden Substraten des Zellmetabolismus in voluminösen Tumoren ist ein Verständnis der relativen Gewichtung oberflächlicher versus tieferer Fluorophore durch die jeweiligen fluorimetrischen Verfahren für eine Wertung der Ergebnisse entscheidend. In diesem Kontext wird die klinische Sensitivität eines fluorimetrischen Verfahrens entscheidend von seiner Fähigkeit, spezifische Fluoreszenz von unspezifischer Gewebeeigenfluoreszenz zu unterscheiden, bestimmt [168, 169]. Weiterhin hängt der empfindliche Nachweis der spezifischen Fluoreszenz erheblich von der Eindringtiefe des anregenden Lichtes ab. Tumorfrees Gewebe, das die Metastase überlagern kann, ist in der Regel mesenteriales Fett oder tumorfreier Lymphknotenanteil. Daraus ergeben sich drei Einflußgrößen, die an einem Phantom untersucht werden sollten:

- i) Distanz zwischen Oberfläche des als Anregungs- und Beobachtungsfaser dienenden Lichtleiters und der Metastase mit erhöhter spezifischer Fluoreszenz,
- ii) Die Streu- und Absorptionseigenschaften der Gewebeschicht zwischen Faseroberfläche und Metastase und
- iii) Die verwendete Anregungswellenlänge und verwendete Fluoreszenzemissionsbande.

Die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals hängt hierbei neben den kontrollierbaren Parametern von einer Reihe von Unbekannten ab, so ist zum Beispiel die Anzahl von PpIX-Molekülen, die eine einzelne Tumorzelle endogen akkumuliert, ebenso unbekannt wie das relative Verhältnis der Quantenausbeuten zwischen Polyporphimer (hier als Fluoreszenzlabel verwandt) und PpIX. Ziel der vorgestellten Untersuchungen ist daher auch nicht, einen präzisen Grenzwert für

die Tiefe einer Detektion einer bestimmten Zellzahl unter wiederum genau bestimmten Bedingungen zu erhalten. Vielmehr soll die Beschreibung eines grundlegenden Zusammenhanges zwischen messbarem Fluoreszenzsignal und Tiefe eines Fluorophors im Gewebe das klinische Potential der Methode abschätzen helfen.

9.2 Material und Methodik

9.2.1 Zellen

Humane Kolon-Karzinomzellen (ATCC HT 29) wurden unter RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS in Langzeitkultur seriell passagiert. Für die Markierungsexperimente wurden frisch vereinzelte Zellen (Trypsin-EDTA) in einer Dichte von 10^4 Zellen / cm^2 ausgesät und 6 h nach der Trypsinisierung mit einer Endkonzentration von 40 mg Natrium-Polyporphimer (Photofrin[®], QLT, Vancouver, Kanada) überschichtet. Nach weiteren 18 Stunden folgte eine einstündige Auswasch- und Leak-off-Phase, danach wurden die Zellen wieder trypsinisiert und gezählt (Neubauerkammer, Mehrfachzählungen, Trypanblau-Vitalität > 90%). Für das biologische Phantom wurde eine Endkonzentration von 5×10^7 Zellen / cm^3 durch Zentrifugation und vorsichtiges Lösen des Pellets hergestellt. Diese Konzentration entsprach etwa einem Zytokrit von 50%. Der Porphyringehalt der Zellen wurde fluorimetrisch nach Lösung in 0,1 N NaOH im Vergleich mit einer Referenzkurve unter nicht-quencheden Anregungsbedingungen und im nicht aggregatbildenden Konzentrationsbereich ermittelt.

Alle Zelllymphknotenkulturarbeiten an markierten Zellen wurden ausschließlich unter substanzspezifisch gefiltertem Licht durchgeführt.

9.2.2 Biologisches Phantom

Als Hintergrund für die Detektion der Polyhematoporphyrinfluoreszenz wurde eine Grundplatte aus einem diffus streuenden Material hergestellt. Hierfür wurde ein Polyesterharz durch monodisperse Beimischung von Quarzglaskugeln von 250 ± 25 nm Radius (Merck, Darmstadt) auf Streueigenschaften eingestellt, wie sie unpigmentiertem menschlichen Gewebe entsprechen. In die Oberfläche dieser Platte wurden Bohrungen von definiertem Volumen bei einem Verhältnis von 1:1

für Durchmesser zu Tiefe eingebracht (21 μl , 12 μl und 6 μl) Bei Anfüllung dieser Volumina mit der oben genannten Stammlösung von 5×10^7 Zellen/ cm^3 resultieren absolute Zellzahlen von 1×10^6 Zellen, 6×10^5 Zellen und 3×10^5 Zellen pro Bohrung. Anhand der unabgedeckten Zelldepots wurde die Beziehung zwischen der Distanz der Lichtquelle/Fluoreszenzdetektionsfaser und der Probe ermittelt. Diese definierten Depots zellulär gespeicherter Fluorophore wurden nun durch operativ gewonnenes, humanes Mesenterialfett und tumorfreie Lymphknotenhälften jeweils unterschiedlicher Dicken abgedeckt. Die in Abhängigkeit vom abdeckenden Gewebetyp- und -stärke resultierenden Signalstärken wurden mit unterschiedlichen Messverfahren aufgezeichnet und verglichen. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 9.1 wiedergegeben.

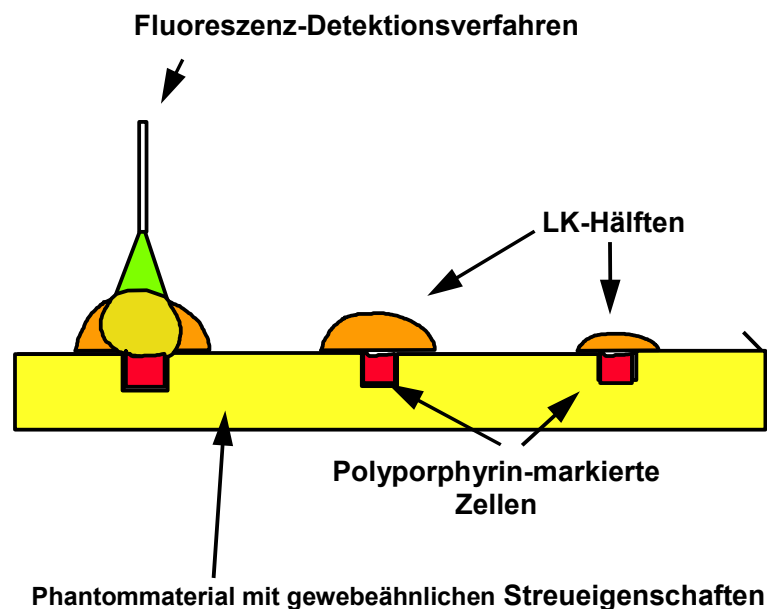


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für das biologische Phantom. Zelldepots mit definiertem Gehalt an Polyporphimer sind mit unterschiedlichen Dicken humaner Frischgewebe abgedeckt.

9.2.3 Fluoreszenzdetektionsverfahren

Das im Rahmen der ex-vivo Untersuchung kolorektaler Lymphknoten angewandte Verfahren nutzt eine Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$. Die Amplitude der Porphyrin-typischen Fluoreszenzbande bei $\lambda_{\text{obs1}} = 634 \text{ nm}$ wird vermessen und auf die unspezifische Gewebeeigenfluoreszenz $\lambda = 595 \text{ nm}$ normiert (siehe Kapitel 3.4). Der Nachteil der Methode ist, dass Anregungs- und Emissionswellenlängen relativ weit auseinanderliegen müssen. Da die Lichtabsorption im Gewebe zu den

kürzeren Wellenlängen hin aber deutlich zunimmt, ist die in unseren Versuchen gewählte Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{ex}} = 505\text{nm}$) nicht unbedingt optimal. Im Hinblick auf die Gewebe Eindringtiefe günstiger wäre es, die Emissionsbande $\lambda_{\text{em}} = 690\text{nm}$ des PpIX bei $\lambda_{\text{ex}} = 630\text{ nm}$ anzuregen. Um hierbei eine Normierung zu ermöglichen, muss aufgrund der eng benachbarten Lage der Anregungs- und Beobachtungsbanden λ_{ex1} und λ_{obs} die unspezifische Autofluoreszenz mit einer zweiten Anregungswellenlänge außerhalb der Q-Banden des Porphyrins angeregt werden. Dieses Verfahren ist als 2-Wellenlängenanregung z.B. bei $\lambda_{\text{ex1}} = 630\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex2}} = 595\text{ nm}$ mehrfach beschrieben [170]. Das normierte spezifische Fluoreszenzsignal ergibt sich nun als Verhältnis R_1

$$R_1 = \frac{I_{633\text{nm}}(700\text{nm}, 20\text{ns})}{I_{595\text{nm}}(700\text{nm}, 0\text{ns})} \quad \text{Gleichung 9.1}$$

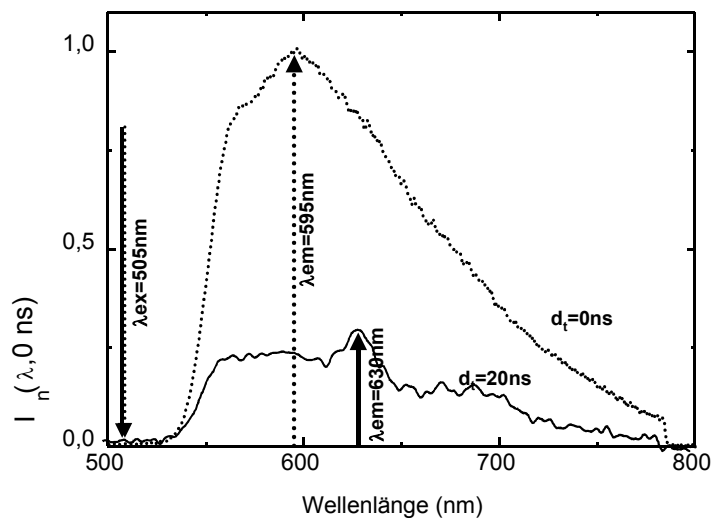


Abbildung 9.2 Quantifizierungsverfahren bei Einwellenlängenanregung durch Fluoreszenzmessung bei 2 Emissionswellenlängen und Verhältnisbildung zwischen verzögert und unverzögert registrierten Spektren

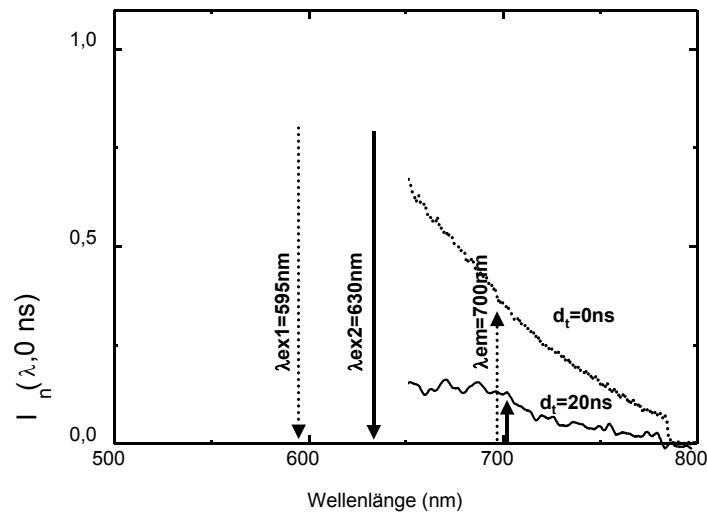


Abbildung 9.3 Quantifizierungsverfahren bei 2 Wellenlängenanregung. Mit Licht bei $\lambda_{ex1} = 630$ nm wird sowohl die unspezifische Gewebefluoreszenz wie die Fluorophor-spezifische Fluoreszenz angeregt, bei $\lambda_{ex2} = 595$ nm nur die unspezifische Gewebeeigenfluoreszenz. Durch Verhältnissbildung der auf die jeweilige Anregung folgenden Emissionsintensitäten bei unterschiedlich zeitverzögert registrierten Spektren ist eine Quantifizierung möglich.

9.3 Ergebnisse

Am Modell kann die Abschwächung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Gewebedicke zum Beispiel maskierenden Mesenterialfettes beschrieben werden. Wie aus Abbildung 9.4 hervorgeht, erfährt die bei $\lambda_{ex} = 505$ nm angeregte spezifische Fluoreszenz bei einer Gewebetiefe von 4 mm eine Abschwächung um ca. 3 Größenordnungen, während unter vergleichbaren Bedingungen bei der 2-Wellenlängenanregung ($\lambda_{ex1} = 595$ nm, $\lambda_{ex2} = 630$ nm) wegen der größeren Eindringtiefe das Signal nur um 2 Größenordnungen abnimmt.

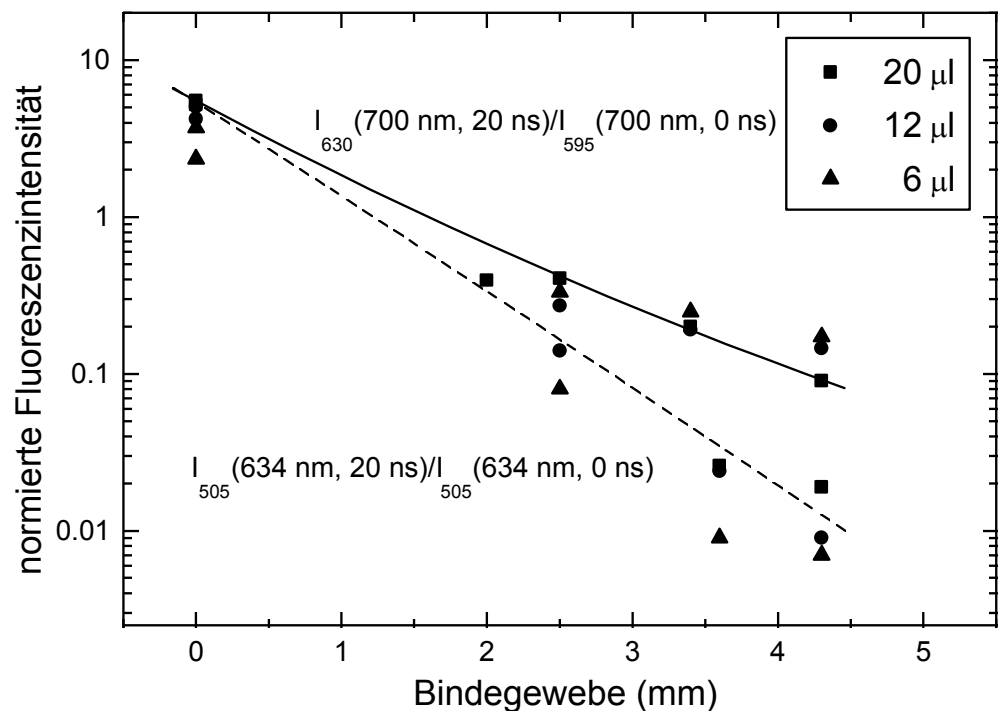


Abbildung 9.4 Darstellung der normierten Fluoreszenzintensitäten von mit Photofrin markierten Tumorzellen in Abhängigkeit von der maskierenden Gewebedicke für die Anregung von zwei verschiedenen Q-Banden (505 nm und 630 nm). Die Normierung erfolgte bei der Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ auf die Autofluoreszenzbande $\lambda = 595 \text{ nm}$ des unverzögerten Fluoreszenzspektrums - - - ,

und im zweiten Fall auf das bei einer Wellenlänge im Minimum der Q-Banden $\lambda = 595 \text{ nm}$ angeregte unverzögerte Spektrum —.

9.4 Diskussion

Seit der Erstbeschreibung digitaler Hintergrundsubtraktionsverfahren durch *Profio* [169] sind eine ganze Reihe verschiedener Verfahren zur Isolierung spezifischer Fluoreszenzsignale vor unspezifischem Gewebefluoreszenzhintergrund publiziert worden. Im wesentlichen zielen diese entweder darauf, durch Fluoreszenzmessung bei unterschiedlichen Wellenlängen, eine davon im Bereich der spezifischen Fluoreszenzemission des gesuchten Fluorophors, eine andere bzw. mehrere andere außerhalb desselben, zur Unterscheidung zwischen der spezifischen und der unspezifischen Fluoreszenz zu verwenden [77, 79, 171, 172]. Hierbei wird in der Regel ein Divisionsverfahren verwendet, um dem ansonsten größenlosen Fluoreszenzwert eine wenigstens relative Quantität zu verleihen (siehe hierzu auch Kapitel 3.4) [77]. Solche Systeme können mit cw-Lasern aufgebaut sein. Das Verfahren eignet sich auch für eine real-time-

Fluoreszenzbildgebung, indem unterschiedlich gefilterte Kamerabilder miteinander verrechnet werden, um Bilder ausschließlich der spezifischen Fluoreszenz darzustellen [121, 173, 174]. Auch mit einer Zweiwellenlängen-Anregung ist die Subtraktion der Autofluoreszenz und die Quantifizierung des spezifischen Fluoreszenzsignals als Verhältnisbildung zur unspezifischen Eigenfluoreszenz möglich [170, 175]. Die beiden Anregungswellenlängen müssen jedoch alternierend verwendet werden, um die Emissionsintensitäten den jeweiligen Anregungswellenlängen zuordnen zu können. Das Verfahren hat den Vorteil, dass die Anregungswellenlängen näher bei den Emissionswellenlängen liegen dürfen und somit für den Fall einer auf die Detektion von Protoporphyrin IX ausgerichtete Instrumentation eine Nutzung der Absorptionsbande bei 630 und der Emissionsbande bei 700 Nanometern möglich wird. Dies ist vor allem dann erstrebenswert, wenn im Unterschied zu dem eingangs zitierten Oberflächendetektionsverfahren eine Fluoreszenzdetektion in einer gewissen Gewebetiefe angestrebt wird. Während auch unpigmentierte menschliche Gewebe im sichtbaren Spektralbereich Wellenlängen unter 600 nm relativ stark absorbieren, geht die Lichtabsorption oberhalb von 600 Nanometern deutlich zurück, um erst ab einer Wellenlänge von etwa 850 Nanometern, bedingt durch die hier beginnende starke Absorption des Wassers, wieder anzusteigen. Dieser Wellenlängenbereich von rot bis ins nahe Infrarot wird daher auch als das *optische Fenster* biologischer Gewebe bezeichnet. Die optischen Eigenschaften menschlicher Gewebe in diesem Bereich des Spektrum werden in einer Reihe von Arbeiten beschrieben [176, 177, 178, 179, 180, 181]. Über die mögliche „Eindringtiefe“ fluoreszenzoptischer Detektionsverfahren gibt es bislang jedoch praktisch keine Untersuchungen. Lediglich aus dem Bereich der Mikroskopie [182] und aus der optischen Kohärenztomographie [183] sind Information vorhanden, die unsere Fragestellungen jedoch nicht beantworten. Bei der optischen Kohärenztomographie wird zum Beispiel die Eindringtiefe ausschließlich für ballistische, d.h. ungestreute Photonen beschrieben. Im Vergleich mit den hier durchgeführten Untersuchungen mag lediglich ein Vergleich mit Untersuchungen von *Yang et al.* [184, 185] interessant sein. Er demonstrierte die fluorimetrische Erkennbarkeit von 800 Mikrometer durchmessenden ‚Green Fluorescent Protein‘-

exprimierenden Tumoren in Mäusen bis zu einer Tiefe von 2,2 mm, und dies unter Verwendung eines relativ einfachen bildgebenden Fluoreszenzsystems. Demgegenüber ist das hier als Zwei-Wellenlängen-Anregungsverfahren beschriebene Vorgehen wesentlich komplexer, die Identifikation der spezifischen Fluoreszenz erfolgt nicht nur auf der Basis von zur Gewebeeigenfluoreszenz unterschiedlichen Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren, sondern auch auf der substanzspezifisch langen Fluoreszenzabklingzeit. Eine Signalabschwächung um drei Größenordnungen zwischen an der Oberfläche liegenden fluoreszenzmarkierten Zellen und ebensolchen Zellen in einer Tiefe von 4 – 5 mm erscheint daher im Vergleich mit den Arbeiten von Yang et al. [185] durchaus plausibel. Wenngleich letztlich nicht konkret bekannt ist, wie hoch die Fluoreszenzintensität der endogenen Protoporphyrin IX-Akkumulation in Tumorzellen ist, so kann jedoch von einer sinnvollen Anwendbarkeit des Verfahrens ausgegangen werden, wenn die Detektionsfaser klinisch in einem Abstand von maximal 5-7 mm zum Ort einer möglichen Tumormetastasierung gebracht werden kann.

Für die Messung zellmetabolischer Substrate in soliden Tumoren bedeutet der in Abbildung 9.4 demonstrierte Zusammenhang allerdings auch, dass das Fluoreszenzsignal von den oberflächlichen Gewebeanteilen dominiert wird (ca. 90% des gemessenen Signals stammen aus dem obersten Millimeter des Gewebes).

10 Protoporphyrin IX-Autofluoreszenz als Prädiktions- und Responseparameter in der neoadjuvanten Therapie des Rektumkarzinoms

10.1 Einleitung

In der Untersuchung von Rektumkarzinom-Resektaten wiesen Patienten nach neoadjuvanter Therapie eine niedrigere PpIX-Fluoreszenz im Primärtumor auf (s. Kapitel 8.3.3.1, Seite 61). In Anbetracht der diskutierten Wechselbeziehungen der Hämsynthese mit dem zellulären Energiestoffwechsel sollte die Eignung der PpIX-Fluoreszenz zur Response-Evaluation überprüft werden.

In der Behandlung des lokal oder lokoregionär fortgeschrittenen Rektumkarzinoms haben sich multimodale Behandlungsansätze weitgehend durchgesetzt. Für eine adjuvante 5-Fluoruracil-basierte Radiochemotherapie ist die Reduzierung von Lokalrezidivraten sowie ein verlängertes krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben durch mehrere prospektive, randomisierte Studien belegt [186, 187]. Eine im Gegensatz zur adjuvanten Behandlung präoperative, neoadjuvante Radiochemotherapie bietet den potentiellen Vorteil einer geringeren Akuttoxizität am Darm sowie das Potential einer höheren Rate sphinktererhaltender Operationen [135, 188, 189, 190]. Um letzteres Potential wirklich ausschöpfen zu können, bedarf es aber eines akkuraten präoperativen Praediktors für das Ansprechen des Tumors auf die Vortherapie.

Konventionelle diagnostische Verfahren eignen sich hierfür nicht. Endosonografisch stellen sich sowohl vitaler Tumor als auch Entzündung oder Nekrose echoarm dar, sodass eine Responsebeurteilung durch Endosonografie nicht zuverlässig ist. So ist zwar relativ häufig eine Verkleinerung des Primärtumors, vorwiegend in seiner Tiefenausdehnung zu verzeichnen, aber gerade die für eine eventuelle Einschränkung der Radikalität so bedeutende komplette Remission wird endosonographisch wesentlich seltener als histomorphologisch diagnostiziert [191]. Auch CT und MRT erreichen hinsichtlich des posttherapeutischen Primärtumorstaging nur eine Genauigkeit von ca. 50% [192]. In den Kapiteln 5-7 konnten wir zeigen, dass u.a. Rektumkarzinome als Ausdruck eines veränderten Häm-Stoffwechsels Protoporphyrin IX, ein fluorimetrisch detektierbares Substrat der Häm-Synthesestoffwechsels, akkumulieren [193]. In einer Querschnittsuntersuchung (Kapitel 8.3.3.1) wurde gezeigt, dass vorbehandelte im Vergleich zu nicht vorbehandelten Primärtumoren niedrigere PpIX-Fluoreszenzsignale aufwiesen. Es war Ziel dieser Untersuchung, die Eignung einer vergleichenden, prä- und posttherapeutischen fluorimetrischen Quantifizierung von PpIX für die Responsebeurteilung von Rektumkarzinomen zu prüfen.

10.2 Patienten und Methodik

10.2.1 Patienten

Eingeschlossen wurden Patienten einer prospektiven, randomisierten Phase III-Studie zur Evaluation von hyperthermer Radiochemotherapie *versus* alleiniger Radiochemotherapie in der neoadjuvanten Therapie lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome [135]. Im Standardtherapiearm erhielten die Patienten eine Radiochemotherapie (RCT) bestehend aus 45 Gy in 1.8 Gy-Fraktionen über 5 Wochen in Kombination mit einer Bolustherapie 5-Fluorouracil (300-350 mg/m²) und Leucovorin (50 mg) an den Tagen 1 bis 5 und 22 bis 26, im Studientherapiearm zusätzlich eine regionale Hyperthermie mit dem Sigma 60 Applikator (BSD-2000) einmal wöchentlich jeweils vor der Strahlentherapie. Die Fluoreszenzuntersuchungen wurden vor und nach der neoadjuvanten Therapie aufgrund eines von der zuständigen Ethikkommission genehmigten Amendments zu dem o.g. Studienprotokoll durchgeführt. Alle Teilnehmer willigten auf der Basis einer separaten Aufklärung in die Untersuchung ein.

Das prätherapeutische Staging basiert im Wesentlichen auf einer 3-D-endosonografischen Untersuchung [194, 195] in Kombination mit einer Computertomografie sowie ggf. einem MRT. Zum Ausschluss einer intraabdominellen Fernmetastasierung wurden die Patienten laparoskopiert. Nach Beendigung der Vortherapie fand ein komplettes Restaging statt. Goldstandard für das posttherapeutische Tumorstaging war die pathohistologische Aufarbeitung des Resektionspräparates, für die Tumorresponse der Vergleich zwischen prätherapeutischer Endosonografie und histopathologischem Staging am Resektat.

10.2.2 Fluoreszenzmessungen

Alle fluorimetrischen Messungen wurden mit der im Kapitel 3.3 geschilderten Apparatur der 2. Generation durchgeführt. Dabei wurde mit einer Faser sowohl die Fluoreszenz angeregt wie das Fluoreszenzsignal detektiert. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{\text{EX}} = 505 \text{ nm}$.

10.2.3 Auswertung

Resultate werden wiedergegeben als quantifizierte *Fluoreszenzintensität* R , (siehe Gleichung 3.6, Kapitel 3.4.2). Der Wert entspricht dem Mittelwert aus 5-7 Messungen über unterschiedlichen Arealen des Tumors und der Normalschleimhaut oral und aboral des Tumors. Die Messpunkte wurden ohne Kenntnis des jeweiligen Spektrums ausgewählt, sodass keine Selektion stattfinden konnte. In Einzelfällen, z.B. bei hochgradig stenosierenden Tumoren, konnten nur Schleimhautmessungen aboral des Tumors durchgeführt werden. Bei den uT0-Fällen war die Zahl der Messpunkte z.T. aufgrund der kleinen Fläche des identifizierbaren ehemaligen Tumorareals geringer.

Darüberhinaus wird die *relative Fluoreszenzintensität* als *Quotient* R_{Tm}/R_{NSH} als Zahl angegeben. Um Veränderungen durch die neoadjuvante Therapie zu beschreiben, wird die prozentuale *Restfluoreszenz* nach neoadjuvanter Therapie angegeben. Dieser Wert errechnet sich wie folgt:

$$\text{Restfluoreszenz} = \frac{R_{Tm, \text{postther.}} * 100}{R_{Tm, \text{präther.}}} \quad \text{Gleichung 10.1}$$

Wo angemessen, wurden statistische Vergleiche parameterfrei mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt [196]. Angegebene p-Werte dienen deskriptiven Zwecken, daher wird auf eine Korrektur für multiple Tests regelhaft verzichtet. Der Terminus ‚signifikant‘ wird unter der Einschränkung teilweise angemessener α -Korrektur bei einem p-Wert <0,05 verwendet. Korrelationen werden nach dem Spearman’schen Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet, da weder von normalverteilten Variablen noch von linearen Korrelationen ausgegangen werden kann. Die Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket SPSS for Windows, Release 9.0.1 vom 11.03.99 (SPSS Inc., USA) durchgeführt.

10.3 Ergebnisse

10.3.1 Patienten

In diese Untersuchung wurden 19 konsekutive Patienten eingeschlossen, einer dieser Patienten wies ein endoluminal wachsendes Lokalrezidiv auf. 16/19

Patienten wurden bei Studieneinschluss endosonografisch uT3 (resp. ruT3) kategorisiert, 3 als uT4. Bei 10 Patienten war endosonographisch ein Befall der regionären Lymphknoten nachweisbar. Bei 2 Patienten bestanden initial Fernmetastasen, diese Patienten wurden ausserhalb der Studie, aber analog dazu, therapiert.

10.3.2 Vortherapie

Neun Patienten erhielten eine Radiochemotherapie mit Hyperthermie (HRCT), einer dieser 9 Patienten wurden dabei ausserhalb der Studie therapiert (Fernmetastasen). 10 Patienten erhielten eine alleinige Radiochemotherapie (RCT). Von diesen 10 Patienten konnten ebenfalls 3 Patienten nicht für die Studie randomisiert werden (Fernmetastasen, kardiale Komorbidität, Zweitkarzinom in der Vorgeschichte).

10.3.3 T-Kategorien nach RCT/HRCT

Ein Downstaging wurde endosonografisch in 4, histopathologisch in 13 Fällen beschrieben (siehe Tabelle 10.1). Tumorsuspekte Lymphknoten ließen sich nach Vortherapie endosonographisch noch bei 5 Patienten, histopathologisch bei 7 Patienten nachweisen. Während der neoadjuvanten Therapie hatten zwei Patienten bildgebend nachweisbare Fernmetastasen neu entwickelt, bei einer weiteren Patientin wurden intraoperativ kleinherdige Lebermetastasen diagnostiziert, sodass nach Abschluß der Therapie bei 5 Patienten ein Stadium IV vorlag.

Der Vergleich der yuT Kategorien mit den ypT Kategorien belegt auch in dieser verhältnismäßig kleinen Patientengruppe die unzureichende Genauigkeit (42%, Overstaging: 53%, Understaging 5%) der Endosonografie nach neoadjuvanter Therapie.

Die überwiegende Anzahl der Tumoren war mäßig differenziert (G2, n=12), vier Tumoren waren schlecht differenziert (G3). Bei den zwei T0 Tumoren konnte aufgrund des fehlenden Tumors kein Grading festgelegt werden, ebenso bei dem Tis-Tumor aufgrund der fehlenden Invasivität. Bei dem dritten T0 Tumor wurde das Grading anhand einer Biopsie aus der Fernmetastase (Leber) festgelegt.

Tabelle 10.1 Tumorstadien prätherapeutisch und posttherapeutisch

ID-Nr.	Vor neoadjuvanter Therapie			Nach neoadjuvanter Therapie						
	uT	uN	M	yuT	yuN	M	ypT	ypN	ypM	G
2	3	0	0	3	0	1	0	x	1	2
3	3	1	0	3	0	0	2	0	0	2
4	3	1	0	3	0	0	2	1	0	2
6	3	0	0	3	0	1	2	x	1	2
7	3	1	0	0	0	0	0	x	0	x
8	3	0	0	3	0	0	3	2	0	3
9	3	0	0	3	0	0	2	0	0	2
10	4	1	1	3	1	1	3	2	1	2
11	3	1	1	3	1	1	3	2	1	2
12	4	1	0	3	0	0	3b	0	0	2
13	3	0	0	3	0	0	0	0	0	x
14	3	0	0	3	0	0	3b	0	0	2
15	3	0	0	3a	0	0	2	0	0	2
18	4	2	0	4	1	0	4b	1	0	3
20	3a	0	0	3	0	0	Tis	x	0	x
21	3a	0	0	3a	0	0	2	0	0	2
22*	3	1	0	3b	1	0	2	x	0	2
25	3	1	0	2	0	0	3c	1	1	3
27	3a	1	0	3	1	0	3b	1	0	3

10.3.4 Fluoreszenzmessungen vor neoadjuvanter Therapie

Abbildung 10.1 und Abbildung 10.2 zeigen Fluoreszenzemissionsspektren von Tumor (ID-Nr.2) und umgebender Normalschleimhaut vor neoadjuvanter Therapie. Zwischen den *in vivo* über dem Tumorgewebe abgeleiteten Spektren und den Fluoreszenzspektren von Biopsaten, die an jeweils korrespondierender Lokalisation abgenommen wurden, besteht kein Unterschied, d.h. das Fluoreszenzsignal ist gegenüber unmittelbaren Durchblutungs- und Oxygenierungsänderungen stabil.

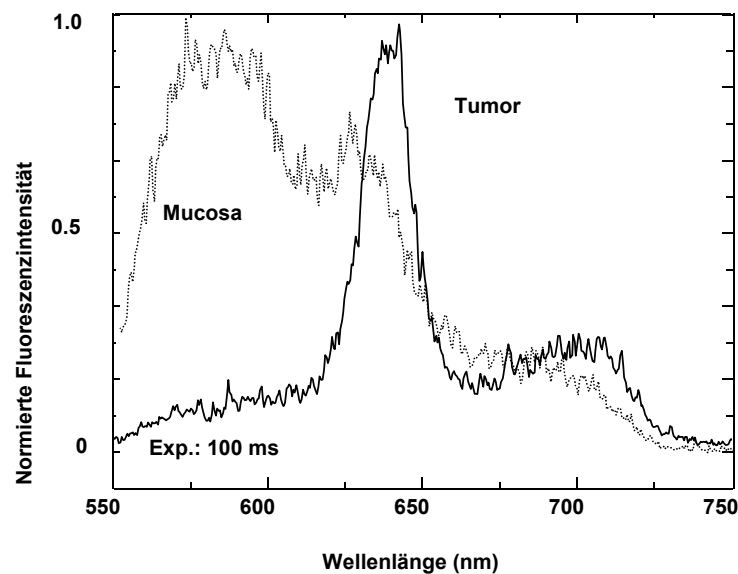


Abbildung 10.1 Normierte Fluoreszenzspektren über uT3 Rektumkarzinom und umgebender Mucosa vor neoadjuvanter Therapie, abgeleitet in vivo während Koloskopie. Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$. Das Emissionsspektrum über dem Tumorgewebe ist von 2 spezifischen Peaks bei $\lambda_{\text{em1}} = 630 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em2}} = 700 \text{ nm}$ gekennzeichnet. Beide Peaks sind auch im Emissionsspektrum der Mucosa erkennbar, jedoch wesentlich schwächer.

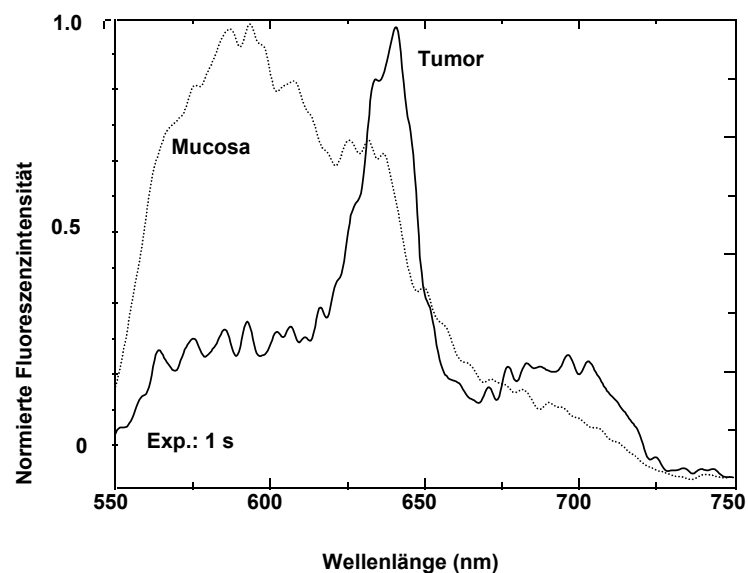


Abbildung 10.2 Normierte Fluoreszenzspektren, ex-vivo registriert über Biopsaten aus uT3 Rektumkarzinom und umgebender Mucosa vor neoadjuvanter Therapie. Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$. Die Spektren sind weitgehend mit den in-vivo-Spektren vergleichbar (siehe Abbildung 10.1), lediglich das Grundrauschen ist aufgrund stabiler Geometrie und längerer Messzeiten geringer.

Bei 17 / 19 Patienten wurden Fluoreszenzmessungen der normalen Rektumschleimhaut oral und aboral des Tumors durchgeführt, bei 2 Patienten mit stenosierenden Tumoren waren nur aborale Messungen möglich. Für die Normalschleimhaut wurde der Median der spezifischen Fluoreszenzintensität R mit 0,78 (Mittelwert: 0,97; Minimum: 0,33; Maximum: 3,64) bestimmt. Für uT3 Karzinome betrug R im Median 5,0 (Mittelwert: 6,02; Minimum: 0,74; Maximum: 19,89). Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{TM}/R_{NSH}) ergab einen Median von 6,17 (Mittelwert: 7,38; Minimum: 1,53; Maximum: 21,16). Bei den 3 uT4 Karzinomen wurden folgende Werte für R gemessen: 1,54, 2,37 und 77,8.

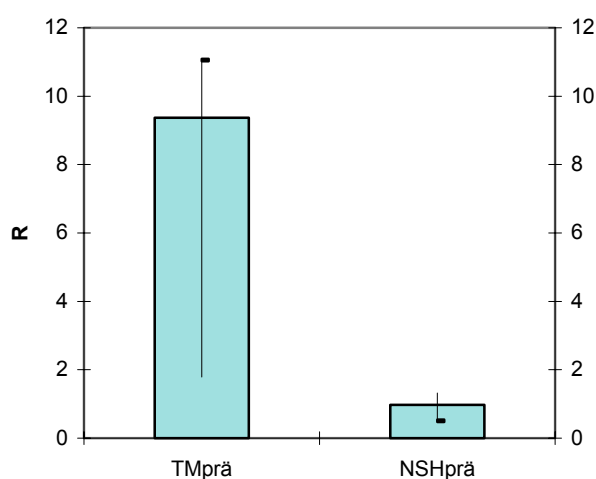


Abbildung 10.3 Spezifische Fluoreszenz R prätherapeutisch für primäre Rektumkarzinome (TM) und normale Rektumschleimhaut (NSH) (1-Sigma-Intervall), $p < 0,005$

10.3.5 Fluoreszenzmessungen posttherapeutisch

Abbildung 10.4 und Abbildung 10.5 zeigen *in vivo* und *ex vivo* an der Biopsie registrierte Emissionsspektren über dem Tumoreal aus Abbildung 10.1 nach Fluoreszenzanregung bei $\lambda_{ex} = 505$ nm. Im Vergleich sind die in Abbildung 10.1 und Abbildung 10.2 beobachteten spezifischen Peaks bei $\lambda_{em1} = 630$ nm und $\lambda_{em2} = 700$ nm nicht mehr, bzw. allenfalls stark abgeschwächt erkennbar. Der Tumor wurde im posttherapeutischen Staging als uT3 kategorisiert, histologisch lag eine komplette Remission vor (pT0).

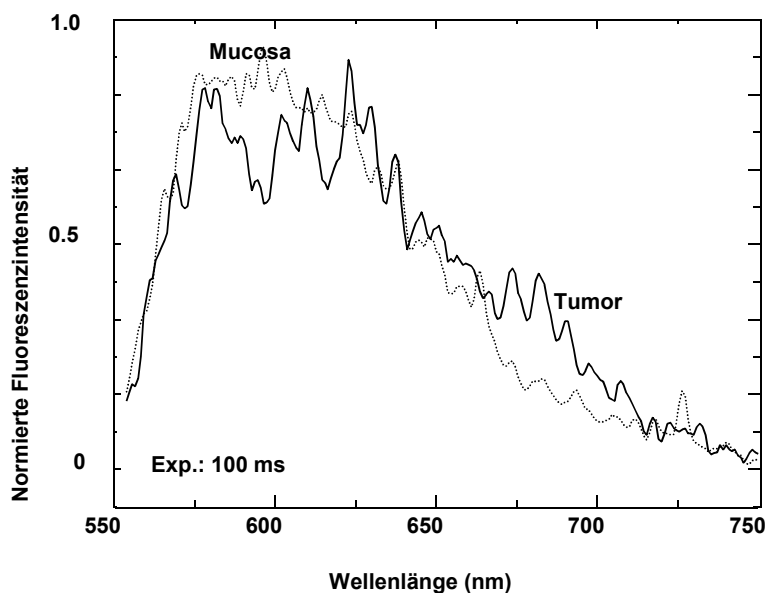


Abbildung 10.4 Normierte Fluoreszenzspektren über Rektumkarzinom und umgebender Mucosa **nach** neoadjuvanter Therapie, abgeleitet in vivo während Koloskopie. Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$. Das Emissionsspektrum über dem Tumorgewebe ist mit dem über der Normalschleimhaut identisch, die in Abbildung 10.1 beobachteten spezifischen Peaks bei $\lambda_{\text{em1}} = 630 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em2}} = 700 \text{ nm}$ sind nicht mehr erkennbar.

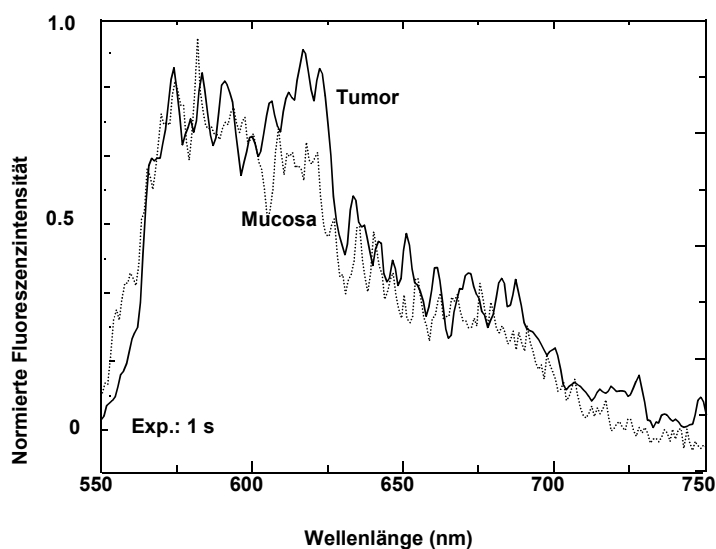


Abbildung 10.5 Normierte Fluoreszenzspektren über Rektumkarzinom und umgebender Mucosa **nach** neoadjuvanter Therapie, abgeleitet ex vivo über Biopsaten aus korrespondierender Lokalisation. Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$. Das Emissionsspektrum über dem Tumorgewebe ist mit dem über der Normalschleimhaut weitgehend identisch, der in Abbildung 10.2 beobachtete spezifische Peak bei $\lambda_{\text{em1}} = 630 \text{ nm}$ ist im Tumorspektrum andeutungsweise erkennbar

Posttherapeutisch zeigte sich bei 17 von 19 Patienten ein Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensität R sowohl in der normalen Schleimhaut (Mittelwert $R_{NSH,prä}/R_{NSH,post} = 0,97/0,68$), als auch im Tumor (Mittelwert $R_{Tm,prä}/R_{Tm,post} = 9,37/2,03$). Die *Fluoreszenzreduktion* im Tumorgewebe war deutlicher ausgeprägt (78%, Mittelwert) als in der Normalschleimhaut (30%, Mittelwert, Abbildung 10.6). Der Abfall der Fluoreszenzintensität R im Tumorgewebe und in der Schleimhaut ist jeweils statistisch signifikant (Vergleich prätherapeutisch versus posttherapeutisch, Tumor: $p < 0,01$, Schleimhaut: $p = 0,049$). Tumorgewebe wies auch posttherapeutisch eine gegenüber der Normalschleimhaut signifikant höhere Fluoreszenzintensität R auf ($p < 0,005$).

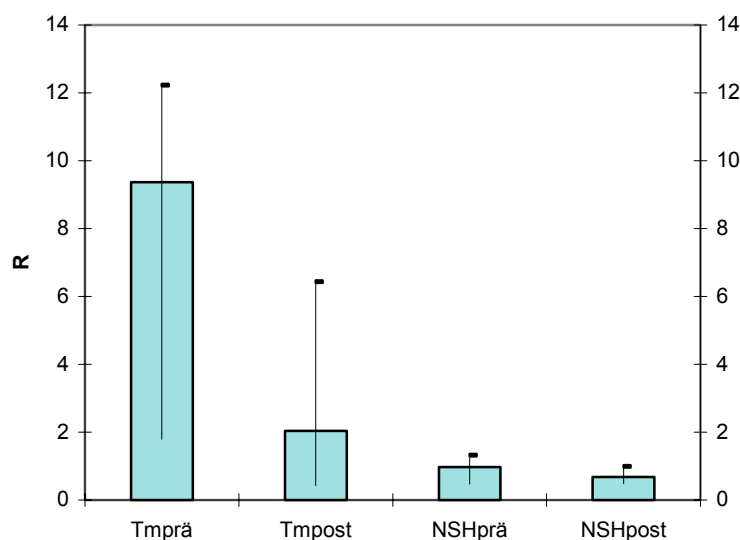


Abbildung 10.6 spezifische Fluoreszenzintensitäten R aller Patienten im Vergleich prä- und posttherapeutisch. Die mit Tmprä und Tmpost bezeichneten Verteilungen (angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen) entsprechen den Messungen im Tumorgewebe prä- und posttherapeutisch ($p < 0,001$), die mit NSHprä und NSHpost bezeichneten Verteilungen den Messungen über der normalen Rektumschleimhaut ($p = 0,049$).

10.3.5.1 Karzinome ypT0

Drei Patienten wiesen nach neoadjuvanter Therapie eine histologische Komplettremission auf (ypT0). Endoskopisch zeigte sich bei allen eine Narbe oder ein Ulkus im Bereich des ehemaligen Tumors, sodass die Fluoreszenzmessung jeweils dort erfolgte. Die spezifischen Fluoreszenzintensitäten R waren vergleichsweise niedrig (Median: 0,42, Mittelwert: 0,55; Minimum: 0,33; Maximum: 0,92). Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) reichte von 0,64 bis max. 1,35

(Mittelwert 1,04), hier bestand kein Unterschied zur umgebenden Normalschleimhaut. In dieser Patientengruppe zeigte sich eine *Fluoreszenzreduktion* um im Median 67% (weitere Einzelwerte 88% und 61%).

10.3.5.2 Karzinome ypTis

Bei einer Patientin war nach neoadjuvanter Therapie lediglich ein Carcinoma in situ nachweisbar (ypTis). Bei dieser Patientin war nach der Therapie im Tumor eine Fluoreszenzintensität R von 0,93 und in der normalen Schleimhaut von 0,53 zu messen. Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) betrug 1,75, was einer *Fluoreszenzreduktion* von 79% entsprach.

10.3.5.3 Karzinome ypT2

Bei sieben Patienten wurde der Tumor posttherapeutisch als ypT2 klassifiziert, darunter war auch eine Patientin mit Lokalrezidiv (rypT2). Die Fluoreszenzintensität R über den Tumoren lag zwischen min. 0,33 und max. 2,98 mit einem Mittelwert von 1,10. Die normale Schleimhaut lag mit Werten von 0,33 bis 0,99 deutlich tiefer (Mittelwert 0,61). Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) betrug 1,16 im Median (Mittelwert: 1,80; Minimum: 0,88; Maximum: 4,97). Die *Fluoreszenzreduktion* betrug im Median 57% (Minimum: -3%, Maximum: 95%).

10.3.5.4 Karzinome ypT3

Sieben Primärtumoren wurden histopathologisch ypT3 kategorisiert.. Fünf davon sind Non-Responder. Hier zeigten sich über fast allen Tumoren weiterhin typische Fluoreszenzspektren. Die normierte Fluoreszenz R lag prätherapeutisch zwischen 1,8 und 77,8 mit einem Mittelwert von 15,1 und einem Median von 3,5. Posttherapeutisch wurden im Tumor R-Werte zwischen 0,66 und 10,13 mit einem Mittelwert von 3,12, und einem Median von 0,88 gemessen. Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) betrug in dieser Patientengruppe prätherapeutisch im Median 3,58 (Mittelwert: 13,97; Minimum: 1,56; Maximum: 58,94), posttherapeutisch im Median 1,83 (Mittelwert: 4,05; Minimum: 1,00; Maximum: 11,33). Die *Fluoreszenzreduktion* betrug im Median 45% (3,1%-73,7%).

10.3.5.5 Karzinome ypT4

Posttherapeutisch wies nur ein Patient ein ypT4 Karzinom auf, der Tumor infiltrierte Prostata und Samenbläschen. Posttherapeutisch liess sich das Tumoreal fluorimetrisch deutlich von der normalen Schleimhaut abgrenzen mit einer spezifischen Fluoreszenzintensität R von 6,43 (R_{NSH} : 1,52). Damit errechnet sich eine *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) von 4,23. Im Vergleich zur Voruntersuchung hat sich der Quotient (R_{Tm}/R_{NSH}) mehr als verdoppelt (231,15% des Ausgangswertes). Es war der einzige Patient bei dem sich eine deutliche Zunahme des Quotienten(R_{Tm}/R_{NSH}) nachweisen ließ.

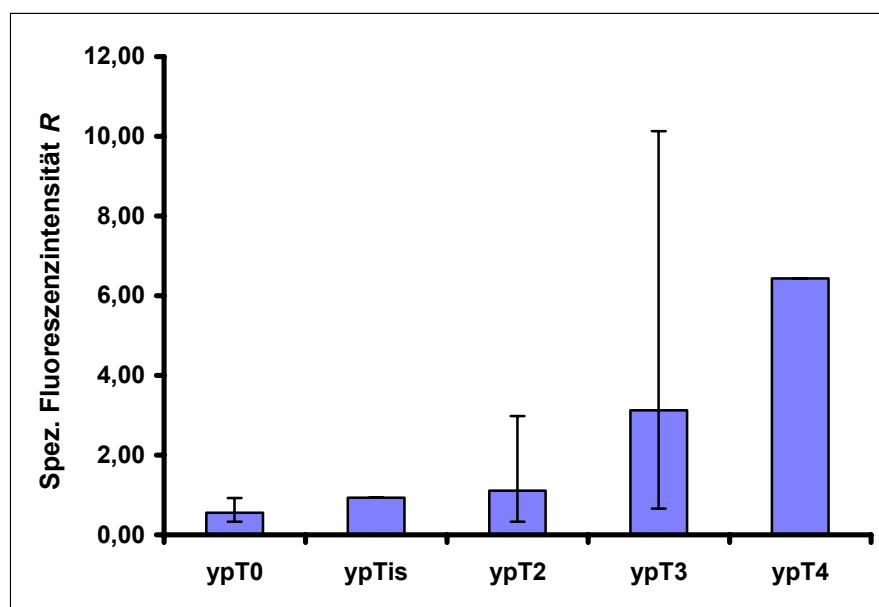


Abbildung 10.7 Spezifische Fluoreszenzintensitäten R im Tumorgewebe in Abhängigkeit von der postoperativen ypT-Kategorie (dargestellt sind Mittelwerte und Spannweite der R-Werte)

10.3.6 Fluoreszenz und Response

13 Patienten wurden als Responder und 6 als Non-Responder eingestuft. Ein Progress war bei keinem Patienten verzeichnet worden.

Weder die prätherapeutisch erhobenen absoluten Fluoreszenzwerte noch die *relativen Fluoreszenzintensitäten* (R_{Tm}/R_{NSH}) ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Responder und der der Non-Responder ($p=0.38$ für (R_{Tm}/R_{NSH}) Responder *versus* Non-Responder), tendenziell wiesen Tumoren der Respondergruppe aber ein höheres initiales Fluoreszenzsignal

(R_{Tm}/R_{NSH} Median: 6,38, Mittelwert: 11,1; Minimum: 1,53; Maximum: 58,94) auf als Tumoren der Non-Responder-Gruppe (R_{Tm}/R_{NSH} Median: 2,9; Mittelwert: 6,27; Minimum: 1,54; Maximum: 18,81,).

Posttherapeutisch war bei den Respondern die spezifische Fluoreszenzintensität R niedriger (Median:0,88; Mittelwert:0,99; Minimum:0,33; Maximum:2,98) als bei den Non-Respondern (Median: 3,64; Mittelwert: 4,30; Minimum: 0,66; Maximum:10,13). Die *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) war ebenfalls bei den Respondern (Median: 1,35; Mittelwert: 1,66; Minimum: 0,64; Maximum: 4,97) geringer als bei den Non-Respondern (Median: 2,65; Mittelwert: 4,75; Minimum: 1,0; Maximum: 11,3).

Hier sei auf die Messungen prätherapeutisch hingewiesen, in denen die Non-Responder eine geringere *relative Fluoreszenzintensität* (R_{Tm}/R_{NSH}) aufwiesen als die Responder (Abbildung 10.8).

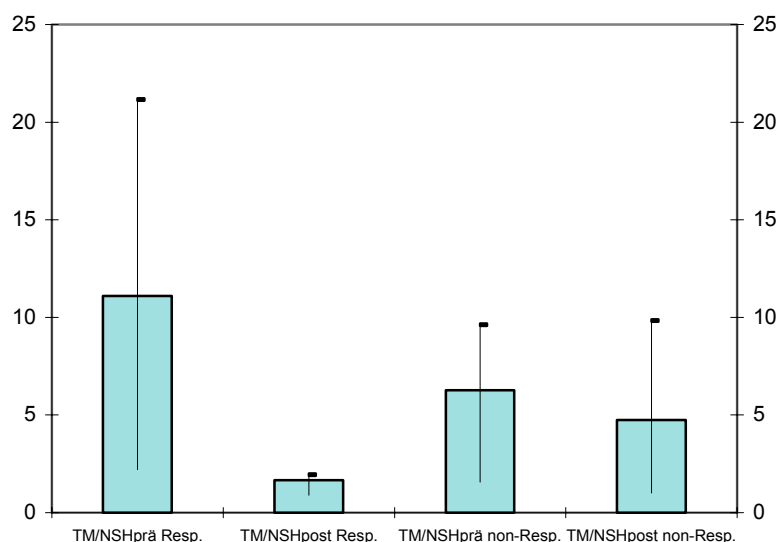


Abbildung 10.8 **Quotient R_{Tm}/R_{NSH}** prätherapeutisch (li.) und posttherapeutisch (re.); prätherapeutisch bei den Respondern höhere relative Fluoreszenzintensität als bei den Non-Respondern, posttherapeutisch umgekehrt; jeweils 1-Sigma-Intervall

Die *Fluoreszenzreduktion* durch die Therapie ist bei den Respondern (Median: 79%; Mittelwert: 65%; Minimum: -3%; Maximum: 97%) ausgeprägter als bei den

Non-Respondern (Median: 51%; Mittelwert: 23%; Minimum: -131%; Maximum: 70%) . Während Gleichung 10.1 die Fluoreszenzreduktion in Bezug auf die *relativen Fluoreszenzintensitäten* (R_{Tm}/R_{NSH}) beschreibt, wird der Effekt noch deutlicher, wenn man die Reduktion der spezifischen Fluoreszenzwerte R nur der Primärtumoren absolut betrachtet ($1-R_{Tm,post}/R_{Tm,prä}$, in %). Hier ergab die Testung nach Mann-Whitney zwischen Respondern (Median: 83%; Mittelwert: 75%; Minimum: 30%; Maximum: 99%) und Non-Respondern (Median: 35%; Mittelwert: -18%; Minimum: -317%; Maximum: 81%) einen p-Wert von $p=0,022$ (Tabelle 10.2).

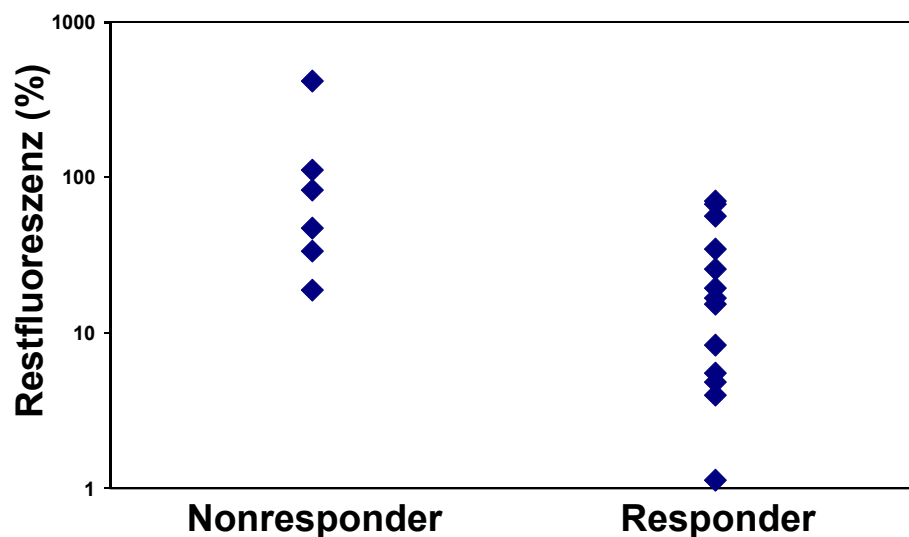


Abbildung 10.9 Werteverteilung der Restfluoreszenz nach neoadjuvanter Therapie ($R_{Tm,post}/R_{Tm,prä}$) in %, Non-Responder ggü. Responder. Die Verteilungen sind mit einem $p=0,022$ verschieden.

Tabelle 10.2 Parameterfreie Testung (Mann-Whitney U-test) aller Fluoreszenzvariablen auf die Gruppenvariable ‚Response‘

	TM _{PRÄ}	NSH _{PRÄ}	rFL _{PRÄ}	TM _{POST}	NSH _{POST}	rFL _{post}	FL.red.	Restfluoresz.
Mann-Whitney-U	27,000	35,000	29,000	25,500	15,000	31,500	20,000	13,000
Wilcoxon-W	48,000	56,000	50,000	116,500	106,000	122,500	41,000	34,000
Z	-1,052	-,351	-,877	-1,185	-2,108	-,658	-1,666	-2,280
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,293	,726	,380	,236	,035	,510	,096	,023
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,323	,765	,416	,244	,036	,521	,106	,022

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: RESP

10.4 Diskussion

Die Beurteilung der Response von Rektumkarzinomen auf neoadjuvante Therapieverfahren beruht heute weitgehend auf bildgebenden diagnostischen Verfahren. Parameter sind eine Volumenreduktion des Primärtumors, besser noch ein Downstaging hinsichtlich der T-Kategorie. Nach Radiochemotherapie spiegelt die Morphologie den Therapieeffekt aber nur sehr ungenügend wieder, da eine Devitalisierung des Tumorgewebes morphologisch erst nach Abschluss längerfristiger Reparationsprozesse zu beschreiben ist. So berichteten *Napoleon et al.* als erste über einen Rückgang der diagnostischen Genauigkeit der Endosonografie bezüglich der Tumordinfiltrationstiefe (uT) von 86 % vor neoadjuvanter Therapie auf 46 % in einer Patientengruppe nach Strahlentherapie [197]. Diese Ergebnisse wurden von *Glaser* [198], *Fleshman* [199] und *Rau* [191] weitgehend bestätigt. Selbst für die endorektale MRT berichten Hofmann et al. in einer Untersuchung von 35 Patienten unter neoadjuvanter hyperthermer Radiochemotherapie eine Genauigkeit eines MR-basierten präoperativen Restaging nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie von nur 54 % [200].

Für das erste Ziel eines neoadjuvanten Therapieansatzes, die Verbesserung der Gesamtprognose unter Beibehaltung eines prätherapeutisch festgelegten chirurgischen Radikalitätsausmaßes, ist die Genauigkeit eines postneoadjuvanten Tumorstagings von nachrangiger Bedeutung. Jedoch wäre eine komplette Response auch als Indikationskriterium für ein reduziert radikales chirurgisches

Verfahren nach Vortherapie, z.B. mit dem Ziel der Sphinktererhaltung, denkbar [201, 202, 203, 204, 205]. In diesem Zusammenhang ist die mangelnde Genauigkeit bildmorphologischer Diagnoseverfahren problematisch. Insbesondere wäre auch eine frühzeitige und valide Beurteilung der therapeutischen Effektivität eines neoadjuvanten Behandlungsregimes Voraussetzung für einen frühzeitigen Therapie- bzw. sogar Konzeptwechsel.

Eine Reihe von Studien hat im letzten Jahrzehnt die Fähigkeit funktioneller Bildgebungstechniken, Veränderungen des Tumormetabolismus als Folge multimodaler Therapieverfahren darzustellen, demonstriert [120, 164, 206, 207, 208, 209].

Wie in Kapitel 7.4 dargelegt wurde, stellt das Protoporphyrin IX ein Schlüsselsubstrat der Häm-Synthese dar. Die Verfügbarkeit von Häm wiederum ist für den zellulären Energiemetabolismus essentiell, sodass der in Korrelation mit dem Ansprechen von Tumoren auf Radiochemotherapie stehende Rückgang der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz möglicherweise durchaus Ausdruck einer therapiebedingten Vitalitätsminderung der Zellen oder einer verminderten Proliferationsaktivität sein kann. In diesem Sinne sind Parallelen mit anderen Verfahren des funktionellen Imaging zu diskutieren.

Die [^{18}F]-Fluorodeoxy-D-Glucose-Positronenemissionstomographie ([^{18}F]-FDG-PET) erlaubt die Quantifizierung der zellulären Glycolyse in vivo und wird gegenwärtig wohl am stärksten für ein Therapiemonitoring und eine frühzeitige Responseprädiktion propagiert. In einer Untersuchung von *Smith et al.* 2000, konnte eine histologisch dokumentierte komplette Tumorrückbildung bei Mammakarzinomen bereits nach dem ersten Zyklus der Therapie mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 74 % prädiziert werden [182]. *Schelling et al.* publizierten zeitgleich in derselben Zeitschrift sogar eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 85 %, bei einem allerdings sehr kleinen Stichprobenumfang von 22 Patienten [183]. Für Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs teilten *Weber et al.* 2001 in einer Untersuchung von 40 Patienten eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 95% für die

Prädiktion einer Tumorrückbildung nach histopathologischen Kriterien mit [210]. Für kolorektale Karzinome beschrieben *Findlay et al.* 1996 einen diskriminativen Wert der FDG-PET auch bei kolorektalen Lebermetastasen [206]. Hierbei ist bemerkenswert, dass die quantitative Reduktion des Glukosemetabolismus bei den Respondern 99 % gegenüber 67 % bei den Non-Respondern betrug. Eine gute Diskrimination zwischen beiden Gruppen wurde nach 4 – 5 Wochen erreicht. Hieraus ergibt sich letztlich, dass das klinisch so bedeutsame Ansprechen des Tumorgewebes auf die Therapie mit einer ganz erheblichen und relativ früh unter Chemotherapie auftretender Reduktion der zellulären Glukolyse auftritt. Es erscheint daher nicht wenig wahrscheinlich, dass solche erheblichen metabolischen Veränderungen auch am unmittelbaren Energiemetabolismus der Zelle ablesbar sein könnten. Im Vergleich mit der apparativ und ökonomisch sehr aufwendigen FDG-PET ist die hier beschriebene fluorimetrische Untersuchung erheblich einfacher durchzuführen. Grundsätzlich ist, eine entsprechende Faserplatzierung vorausgesetzt, auch ein kontinuierliches Monitoring der Vorgänge z. B. unter Radiotherapie bzw. unter Hyperthermie möglich.

Ein weiteres Verfahren ist in diesem Zusammenhang zu diskutieren. Die Magnetresonanzspektroskopie ist grundsätzlich ebenfalls in der Lage, tumormetabolische Veränderungen unter Therapie zu detektieren. Hierbei hat sich vor allem der Rückgang im Verhältnis von Phosphormonoestern gegenüber β -Adenosintriphosphat als diagnostisch führend erwiesen [211]. Technisch ist das Verfahren derzeit noch auf relativ oberflächliche Läsionen beschränkt, sodass bislang Daten im Wesentlichen für Extremitätentumoren [42, 211, 212] und für Hirntumoren [177] sowie Mammakarzinome [179, 181] vorliegen. Die mit diesem Verfahren beobachtete Korrelation zwischen therapeutischem Ansprechen der Tumoren und dem Rückgang der energiereichen Phosphate lässt parallele Alterationen des zellulären Energiestoffwechsels plausibel erscheinen.

Wenngleich die bisher untersuchten Fälle nicht zu allen Fragestellungen aussagekräftig sind, so zeigt sich doch tendenziell, dass Tumoren mit einem prätherapeutisch höheren Protoporphyrin IX-Gehalt besser auf die Vortherapie

ansprechen und dass ein Verschwinden oder eine sehr deutliche Rückbildung der PpIX-Anreicherung posttherapeutisch mit histologischem Ansprechen korreliert.

Die Fluoreszenzmessungen an Tumoren vor Therapie bestätigen zunächst die Beobachtungen aus den Kapiteln 5-7, wonach ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des Protoporphyrin-typischen Fluoreszenz-Peaks zwischen Tumor- und Normalschleimhaut besteht. Posttherapeutisch ist dieses Fluoreszenzniveau gegenüber prätherapeutisch signifikant vermindert, wobei die Korrelation zu den ypT-Kategorien in gewissem Maße Aufschluss gibt über die Korrelation zwischen dem Ausmaß des Tumoransprechens und der relativen Intensität der Protoporphyrinfluoreszenz *R*. Kategorisiert man die Patienten auf der Basis eines Downstaging durch die neoadjuvante Therapie in eine Gruppe der Responder und eine der Nonresponder und vergleicht zwischen diesen beiden Gruppen den Rückgang der relativen Tumorfluoreszenz von prä- auf posttherapeutisch, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Hierbei ist das Kriterium Downstaging für das tatsächliche Ansprechen des Primärtumors auf zellulärer Ebene zwar relativ spezifisch, jedoch keinesfalls sensitiv, wodurch sich möglicherweise der verbleibende Überlappungsbereich erklären lässt. Darüberhinaus besteht auch ein tendenzieller Unterschied hinsichtlich der präoperativen PpIX-Anreicherung zwischen Respondern und Non-Respondern, eine mögliche Prädiktion des Therapieerfolges ist aber sicher auf breiterer Zahlenbasis noch zu verifizieren.

Um den tatsächlichen klinischen Wert einer fluorimetrischen Protoporphyrin IX-Detektion zur Responsebeschreibung gastrointestinaler Karzinome zu etablieren, ist es im Vergleich zu den beschriebenen Ergebnissen weiterhin erforderlich, Fluoreszenzmessungen auch zu einem früheren Zeitpunkt und evtl. unter Therapie durchzuführen. Hierbei ist idealerweise eine Korrelation mit FDG-PET-Untersuchungen anzustreben. Diese Untersuchungen sind in Vorbereitung.

11 Zusammenfassung

Eine präzise Ausbreitungsdiagnostik ist entscheidende Voraussetzung für eine dem individuellen Krankheitsgeschehen angemessene, chirurgisch-onkologische Therapie. Die unterschiedlichsten klinischen Fragestellungen können auf die Erkennung von Tumorzellen in makroskopisch unauffälligen oder nicht eindeutig tumorösen Gewebeanteilen reduziert werden. Verfahren zur Erkennung einer klinisch okkulten Metastastasierung müssen eine hohe Diskriminationsfähigkeit besitzen. So beruht die hohe Sensitivität nuklearmedizinischer Markierungsverfahren unter anderem auf der sehr niedrigen Hintergrundradioaktivität menschlicher Gewebe. Fluorimetrische Methoden besitzen ebenfalls das Potential hoher Sensitivität, da fluoreszierende Moleküle im biologischen Milieu relativ betrachtet sehr selten sind und fluorimetrische Techniken grundsätzlich die Detektion sehr geringer Signalintensitäten zulassen. Unter Verwendung exogener Substanzen, sogenannter Photodiagnostika, existieren bereits Verfahren für die Detektion oberflächlicher Dysplasien und Neoplasien, die bei bestimmten Erkrankungen (z.B. in der Harnblase und in den Bronchien) bereits klinische Anwendung finden. Für den peri- und intraoperativen Einsatz solcher Verfahren, aber auch um die generelle Limitation auf epitheliale Oberflächen zu überwinden, war eine technologische Entwicklung in Richtung auf eine sensitive Detektion von Tumorgewebe auch in einer gewissen Gewebetiefe erforderlich. Hierzu wurde neben den üblichen Verfahren zur Fluoreszenzdiskrimination auch erstmals eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmesstechnik zur Erhöhung der Sensitivität für langlebige Fluorophore evaluiert.

Mit dem primären Ziel, ein hochsensitives Tiefendetektionsverfahren für exogen zugeführte, respektive durch exogene Substratzufuhr akkumulierte Fluorophore zu entwickeln, wurden zunächst zeitaufgelöst Autofluoreszenzcharakteristika kolorektaler Primärtumoren und derer Metastasen (Lymphknoten, Leber) nebst korrespondierender Normalgewebe (Kolon- und Rektumschleimhaut) untersucht. Hierbei zeigte sich die Anreicherung eines langlebigen, porphyrinähnlichen Fluorophors in Tumorgeweben. Für große Karzinome des Gastrointestinaltraktes

war eine solche Fluoreszenz vorbeschrieben, aber hinsichtlich der Natur des Fluorophors und der Ursachen seiner Akkumulation nur sehr unzulänglich untersucht. Auch war mit den bisherigen fluorimetrischen Techniken mangels Sensitivität der Verfahren kein eigenständiger diagnostischer Nutzen erreichbar. Nicht vorbeschrieben war die Akkumulation eines offenbar identischen Fluorophors auch in regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (u.a. Leber, Peritoneum). Neben dem unmittelbaren potentiellen diagnostischen Nutzen bot diese Beobachtung auch einen Zugang für die weitere Erforschung andernorts bereits vermuteter spezifischer Veränderungen des Hämstoffwechsels der Tumorzellen.

Die fluorimetrische Charakterisierung des Fluorophors sowie alle weiteren fluorimetrischen Messungen wurden mit zwei konsekutiv von der Abteilung 8 der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin in der Robert-Rössle-Klinik realisierten Fluoreszenzmessplätzen durchgeführt. Gemeinsames Prinzip beider Apparaturen war die anregungsseitige Bereitstellung von Laserpulsen von 2-3 ns Dauer bei durchstimmbarer Wellenlänge im Bereich von $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$ bis $\lambda_{\text{ex}} = 700 \text{ nm}$ durch Verwendung eines Nd:YAG-Laser gepumpten optisch parametrischen Oszillators. Detektionsseitig wurde eine zeitaufgelöste Spektralanalyse durch einen mit Bezug zum Anregungspuls intensivierbaren optischen Multikanalanalysator realisiert. Durch mathematische Verfahren zur Isolation der langlebigen Fluoreszenzkomponente konnte zunächst die spektrometrische Identität der Fluorophore in Primärtumor und Metastasen sowie die Übereinstimmung mit Excitations- und Emissionsspektren von Protoporphyrin IX (PpIX) - Standardlösung demonstriert werden. Dünnschichtchromatographische und flüssigkeitschromatographische Untersuchungen belegten ebenfalls das Vorhandensein von PpIX in Primärtumoren und deren Metastasen.

Zur Klärung der metabolischen Ursachen einer PpIX-Anreicherung in kolorektalen Tumoren wurden Schlüsselenzyme der Häm-Synthese auf mRNA und auf Proteinebene untersucht. Durch eine Genchip-Hybridisierung (Affymetrix) wurde die Expression von insgesamt 11 Enzymen des Häm-Metabolismus zwischen Normalschleimhaut gesunder Patienten sowie Tumorgewebe von zwei

prognostisch unterschiedlich zu bewertenden Kolonkarzinomgruppen verglichen. Das Expressionsprofil entspricht einer gesteigerten Hämsynthese, wobei allerdings der erste Schritt der Hämsynthese, die 5-Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-S) minderexprimiert ist. Das letzte Enzym der Hämsynthese, das Protoporphyrin IX zu Häm metabolisierende Enzym Ferrochelatase, war durch die Chip-Untersuchung nicht adäquat zu charakterisieren, weshalb hier eine quantitative RT-PCR durchgeführt wurde. Diese belegte in Rektum- wie in Kolonkarzinomen eine signifikante Minderexpression der Ferrochelatase. Für einzelne Enzyme wurden die Expressionsunterschiede in Chip-Hybridisierungssays und PCR durch Messungen der enzymatischen Aktivität untermauert. Das beobachtete Expressionsprofil der Hämsynthese in kolorektalen Tumoren könnte mit einer allgemeinen Aktivierung der Hämsynthese bei negativer Feedback-Regulation der ALA-S und der Ferrochelatase durch Häm erklärbar sein. Die Akkumulation von PpIX würde somit aus einer vermehrten Synthese bei gleichzeitig über negatives Feedback reduzierter Aktivität der Ferrochelatase resultieren. Diese Beobachtungen erklären auch die selektive Bildung von PpIX in Tumorgewebe nach exogener Zufuhr von 5-Aminolävulinsäure. Für beweisende, funktionelle Untersuchungen an einem Zellsystem ist die weitere Förderung beantragt.

Im Weiteren war zu prüfen, inwieweit die beobachtete PpIX-Akkumulation für eine perioperative, lymphonodale Ausbreitungsdiagnostik nutzbar ist. In zwei konsekutiven ex-vivo-Studien wurden insgesamt 1224 palpable Knoten aus dem mesenterialen Fett von Resektionspräparate von 42 Patienten mit kolorektalen Neoplasien auf PpIX-Fluoreszenz untersucht. Die PpIX-Fluoreszenz wurde durch den quantitativen Fluoreszenzparameters **R** beschrieben. Die Werteverteilung von **R** war hochsignifikant verschieden zwischen tumorbefallenen und tumorfreien regionären Lymphknoten. Unter arbiträrer Wahl eines diskriminativen Wertes von **R**=1 resultierte eine Sensitivität für die Erkennung von Lymphknotenmetastasen von 65-62% bei einer Spezifität von 85-78% (Pilotstudie/Validierungsstudie, nicht vorbehandelte Patienten). In patientenindividueller Analyse unter Simulation einer fluoreszenzgeführten Lymphknotenbiopsie resultierte bei Annahme einer histologischen Untersuchung eines einzelnen Lymphknotens eine korrekte

Prädiktion des Nodalstatus in 29/32 Fällen (11/14 pN+ Fälle), bei Untersuchung der 2 Lymphknoten mit den jeweils höchsten Fluoreszenzwerten bereits eine korrekte Prädiktion in 31/32 (13/14 pN+) Fällen. Die pathologische Reevaluation durch Serienschnitte sowie Cytokeratin-Immunhistochemie fluoreszenz-positiver aber routinopathologisch normaler Lymphknoten ergab in 15% der untersuchten Präparate Mikrometastasen.

Bezüglich der Praktikabilität einer intraoperativen Anwendung wurde die Abhängigkeit des spezifischen Fluoreszenzsignals von der Tiefe einer zirkumskripten Fluorophor-Konzentration im Gewebe anhand eines biologisches Phantoms ermittelt. Auf Grund der erhobenen Daten kann eine Detektionstiefe von ca. 5 mm als realisierbar angesehen werden.

Nachdem in der Untersuchung von Rektumkarzinom-Resektaten eine niedrigere PpIX-Fluoreszenz in Rektumkarzinomen nach neoadjuvanter Therapie gemessen wurde, sollte die Eignung der PpIX-Fluoreszenz zur Response-Evaluation überprüft werden. An 19 Rektumkarzinompatienten wurde die Tumorfluoreszenz vor und nach neoadjuvanter Radiochemotherapie vermessen. Die Tumorfluoreszenz war nach Vortherapie signifikant erniedrigt. Das Ausmaß der Fluoreszenzreduktion war mit der histologischen Response korreliert. Es ist demnach denkbar, dass die PpIX-Fluoreszenz als Verfahren für eine Beurteilung der metabolischen Aktivität eines Tumors sinnvoll in der Beurteilung eines Ansprechens auf neoadjuvante Therapieverfahren einsetzbar wird. Eine frühzeitige und valide Detektion eines Tumoransprechens auf neoadjuvante Therapieverfahren würde auch differenziertere chirurgische Strategien ermöglichen.

12 Kooperation und Drittmittelförderung

12.1 Kooperationen

Die vorstehenden Forschungsarbeiten wurden in Kooperation mit insgesamt 3 externen Forschungseinrichtungen und einer abteilungsinternen Arbeitsgruppe durchgeführt:

Die Abteilung 8 *„Medizinische Metrologie und Messtechnik“* der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) Berlin (Leiter Prof. Dr. rer. nat. H. Rinneberg, weitere Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Bernd Ebert, Dr. rer. nat. U. Suckowski, Dipl. Phys. Dirk Nolte). Die Kooperation ist durch einen formalen Kooperationsvertrag definiert. Alle geschilderten Fluoreszenzmessungen sind von Mitarbeitern der PTB an einem PTB-eigenen Fluoreszenzmessplatz in der Robert-Rössle-Klinik durchgeführt worden. Die Vermessung der Spektren sowie die Entwicklung der Quantifizierungsalgorithmen wurde von Mitarbeitern der PTB durchgeführt. Versuchskonzeption und Durchführung erfolgte, wo angegeben, in direkter Kooperation.

Die Abteilung Klinische Chemie der Universität Marburg (Leiter Prof. Dr. M. O. Doss) führte Teile der biochemischen Identifikation von Gewebefluorophoren aus.

Das Department of Radiation Biology am Roswell Park Cancer Center (Leitung: Prof. Dr. T.J. Dougherty, Mitarbeiter Dr. Ravindra Pandey) kooperierte in der Etablierung der Porphyrinextraktionsmethoden.

Darüberhinaus besteht eine enge, abteilungsinterne Kooperation mit Herrn PD Dr. rer. nat. W. Kemmner.

12.2 Drittmittelförderungen

Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter den Aktenzeichen Mo 534/3 und Mo534/4 gefördert.

13 Danksagungen

Mein Dank gebührt zunächst den Mitarbeitern der Klinik, die mich weit über das im Rahmen ihrer normalen Dienstaufgaben erforderliche Maß hinaus unterstützt haben.

Herrn Dr. Tim Handke danke ich für die Durchführung flüssigkeitschromatografischer Experimente, z.T. am Roswell Park Cancer Institute in Buffalo. Herrn Dr. Nowack danke ich für die akribische Durchführung und Dokumentation der Lymphknotenevaluationsstudie. Herrn Schild, der leider zwischenzeitlich tragisch verstarb, gilt mein Dank für die Durchführung der extensiven Lymphknotenpräparationen. Frau Wendler gilt mein Dank für Ihre ständige Bereitschaft, die Tumorbank der Klinik nach geeigneten Präparaten zu durchforsten sowie für vielfältige technische Assistenz. Diesen Dank möchte ich auf alle MTLAs des Bereiches Pathologie ausdehnen, die den zeitlichen Verzug in der Aufarbeitung von Präparaten stets willig hingenommen haben.

Mein Dank gilt weiterhin den Pathologen Frau Dr. Schneider und Herrn Dr. Haensch, die die pathologische Einzeldokumentation der Vielzahl der Lymphknotenpräparate zu bewältigen hatten, und die jederzeit bereitwillig Umstellungen ihrer Routineabläufe zum Zwecke der Forschung akzeptierten.

Herrn PD Dr. rer. nat. W. Kemmner gebührt mein Dank für die Aufnahme in sein Labor sowie für die Beratung und konkrete Hilfe in Planung, Durchführung und Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen.

Die vorgestellte Arbeit beruht darüberhinaus auf der Kooperation mit mehreren externen Forschungsgruppen.

Physikalisch-Technische Bundesanstalt

Ohne die enormen personellen und apparativen Ressourcen, die die Abteilung 8 der PTB unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Rinneberg in die verschiedenen Projekte investierte, wären die vorgestellten Arbeiten nicht möglich gewesen. Das persönliche Engagement von Herrn Prof. Rinneberg erstreckte sich hierbei von der ausführlichen, konstruktiven Diskussion bis zu ebenso ausführlichen Korrekturen an gemeinsamen Manuskripten.

Den Grossteil der physikalischen Messungen und einen ganz erheblichen Anteil an den physikalischen Inhalten hat aber ohne Zweifel Herr Dr. rer. nat. habil. Bernd Ebert geleistet, dem hier mein ganz besonderer Dank gilt.

Roswell Park Cancer Institute

Meinem ehemaligen wissenschaftlichen Mentor Herrn Prof. Dr. Tom J. Dougherty sowie seinem Mitarbeiter, Herrn Dr. Ravindra K. Pandey gilt mein Dank für die unkomplizierte Übernahme einer Kooperation auf dem Gebiet der biochemischen Charakterisierung des bis dahin unbekannten Fluorophors.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem chirurgischen Lehrer, wissenschaftlichen Mentor und Chef, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter M. Schlag, der die beschriebenen Projekte über Jahre begleitete und förderte – auch durch konstruktive Kritik.

14 Literaturverzeichnis

- [1] Yeo, C. J. (2000): The Johns Hopkins experience with pancreaticoduodenectomy with or without extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, *J.Gastrointest.Surg.* (Band 4), Nr. 3, Seite 231-232.
- [2] Gebhardt, C.; Meyer, W.; Reichel, M. und Wunsch, P. H. (2000): Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma, *Langenbecks Arch.Surg.* (Band 385), Nr. 1, Seite 14-20.
- [3] Kwarada, Y.; Das, B. C.; Naganuma, T. und Isaji, S. (2001): Surgical treatment of pancreatic cancer. Does extended lymphadenectomy provide a better outcome?, *J.Hepatobiliary.Pancreat.Surg.* (Band 8), Nr. 3, Seite 224-229.
- [4] De Matteis, F. (1988): Toxicological aspects of liver heme biosynthesis, *Semin.Hematol.* (Band 25), Nr. 4, Seite 321-329.
- [5] Furuyama, K. und Sassa, S. (2000): Interaction between succinyl CoA synthetase and the heme-biosynthetic enzyme ALAS-E is disrupted in sideroblastic anemia, *J.Clin.Invest* (Band 105), Nr. 6, Seite 757-764.
- [6] Hida, J.; Yasutomi, M.; Maruyama, T.; Fujimoto, K.; Nakajima, A.; Uchida, T.; Wakano, T.; Tokoro, T.; Kubo, R. und Shindo, K. (1998): Indication for using high ligation of the inferior mesenteric artery in rectal cancer surgery. Examination of nodal metastases by the clearing method, *Dis.Colon Rectum* (Band 41), Nr. 8, Seite 984-987.
- [7] Leggeri, A.; Roseano, M.; Balani, A. und Turollo, A. (1994): Lumbosacral and iliac lymphadenectomy: what is the role today?, *Dis.Colon Rectum* (Band 37), Nr. 2 Suppl, Seite S54-S61.
- [8] Hermanek, P.; Wiebelt, H.; Staimmer, D. und Riedl, S. (1995): Prognostic factors of rectum carcinoma--experience of the German Multicentre Study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal Carcinoma, *Tumori.* (Band 81), Nr. 3 Suppl, Seite 60-64.
- [9] Porter, G. A.; Soskolne, C. L.; Yakimets, W. W. und Newman, S. C. (1998): Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer [see comments], *Ann.Surg.* (Band 227), Nr. 2, Seite 157-167.
- [10] Zaheer, S.; Pemberton, J. H.; Farouk, R.; Dozois, R. R.; Wolff, B. G. und Ilstrup, D. (1998): Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum, *Ann.Surg.* (Band 227), Nr. 6, Seite 800-811.
- [11] Jessup, J. M.; Stewart, A. K. und Menck, H. R. (1998): The National Cancer Data Base report on patterns of care for adenocarcinoma of the rectum, 1985-95, *Cancer* (Band 83), Nr. 11, Seite 2408-2418.
- [12] Miles, E. (1908): A method of performing abdominopelvic excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon, *Lancet* (Band 2), Seite 1812-1813.
- [13] Clogg, H. S. (1908): Cancer of the colon : A study of 72 cases, *Lancet* (Band 2), Seite 1007-1012.
- [14] Halsted, W. S (1884): Results of Operation for Cure of Breast Cancer performed at Johns Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894, *Ann Surg* (Band 20), Seite 497.
- [15] Moynihan, B. (1908): The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexure and rectum, *Surg Gynecol Obstet* (Band 6), Seite 463-466.
- [16] Dickson, C. F. (1948): Anterior resection from malignant lesions of the upper part of the rectum and lower part of the sig., *Ann Surg* (Band 125), Seite 425.
- [17] Gabriel, W.; Dukes, C. E. und Bussey, H. (1935): Lymphatic spread in cancer of the rectum, *Br.J.Surg.* (Band 23), Seite 395-423.

- [18] Westhues, H. (1934): Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Chirurgie des Rektumkarzinoms, Georg Thieme, Leipzig.
- [19] Turnbull, R. D.; Keil, K.; Watson, F. R. und Spread, J. (1967): Cancer of the Colon : The Influence of the No-Touch-Isolation-Technique on Survival Rates, Ann Surg (Band 166), Seite 420-427.
- [20] Patell, S. C.; Tovee, E. B. und Langer, B. (1977): 25 years of experience with radical surgical treatment of carcinoma of the extraperitoneal rectum, Surgery (Band 82), Seite 460-465.
- [21] Lokatio, S. A.; Eng, K. und Coppa, G. F. (1983): Abdominosacral resection for mid-rectal cancer, a 15 year experience, Ann Surg (Band 198), Seite 320 -324.
- [22] McDermott, F. T.; Hughes, E. S.; Pihl, E.; Johnson, W. R. und Price, A. B. (1985): Local recurrence after potentially curative resection for rectal cancer in a series of 1008 patients, Br.J.Surg. (Band 32), Seite 34-37.
- [23] Heimann, T. M.; Szporn, A.; Bulnick, K. und Aufses, A. H. J. (1986): Local recurrence following surgical treatment of rectal cancer. Comparison of anterior and abdominoperineal resection., Dis.Colon Rectum (Band 29), Seite 862-864.
- [24] Rubbini, M.; Vettorello, G. F. und Guerrera, C. (1990): A prospective study of local recurrence after resection and low stapled anastomoses in 183 patients with rectal cancer., Dis.Colon Rectum (Band 33), Seite 117-121.
- [25] Michelassi, F.; Block, G. E.; Vannucci, L.; Montag, A. und Chappell, R. (1988): A 5 to 21 year follow-up and analysis of 250 patients with rectal adenocarcinoma, Ann Surg (Band 208), Seite 279-286.
- [26] Enker, W. E.; Laffer, U. T. und Block, G. E. (1979): Enhanced survival of patients with colon and rectal cancer is based upon wide anatomic resection, Ann Surg (Band 190), Seite 350-360.
- [27] Enker, W. E.; Philipsen, S. J. und Heilweil, M. L. (1986): En bloc pelvic lymphadenectomy and sphincter preservation in the surgical management of rectal cancer, Ann Surg (Band 203), Seite 426-433.
- [28] Glas, R. E.; Ritchie, J. K.; Thompson, H. R. und Mann, C. V. (1985): The results of surgical treatment of cancer of the rectum by radical resection in extended abdominoiliac lymphadenectomy, Br.J.Surg. (Band 72), Seite 599-601.
- [29] Stearns, M. W. und Deddish, M. R. (1959): Five-year-results of abdominopelvic lymph node dissection for carcinoma of the rectum, Dis.Colon Rectum (Band 2)-1969.
- [30] van der Hiel, B.; Pauwels, E. K. und Stokkel, M. P. (2001): Positron emission tomography with 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in oncology. Part IIIa: Therapy response monitoring in breast cancer, lymphoma and gliomas, J.Cancer Res Clin.Oncol. (Band 127), Nr. 5, Seite 269-277.
- [31] Stelzner, F. (1998): Chirurgie an den visceralen Abschlusssystemen, Thieme Verlag Stuttgart.
- [32] Kostakoglu, Lale; Coleman, Morton; Leonard, John P.; Kuji, Ichiei; Zoe, Holly und Goldsmith, Stanley J. (2002): PET predicts prognosis after 1 cycle of chemotherapy in aggressive lymphoma and Hodgkin's disease, J.Nucl.Med. (Band 43), Nr. 8, Seite 1018-1027.
- [33] Stelzner, F. (1989): Die Begründung, die Technik und die Ergebnisse der knappen transanoabdominalen Kontinenzresektion. [Anatomical basis, technic and results of narrow transanoabdominal continence resection], Langenbecks Arch.Chir (Band 374), Nr. 5, Seite 303-314.
- [34] Heald, R. J. und Ryall, R. D. H. (1986): Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer, Lancet, Seite 1479-1482.
- [35] MacFarlane, J. K.; Ryall, R. D. und Heald, R. J. (1993): Mesorectal excision for rectal cancer [see comments], Lancet (Band 341), Nr. 8843, Seite 457-460.

[36] Koyama, Y.; Moriya, Y. und Hojo, K. (1984): Effects of extended systematic lymphadenectomy for adenocarcinoma of the rectum--significant improvement of survival rate and decrease of local recurrence, *Jpn.J.Clin.Oncol.* (Band 14), Nr. 4, Seite 623-632.

[37] Hojo, K.; Sawada, T. und Moriya, Y. (1989): [The value and limit of extended surgery in colorectal cancer], *Gan To Kagaku Ryoho* (Band 16), Nr. 4 Pt 2-1, Seite 1059-1063.

[38] Moriya, Y.; Hojo, K.; Sawada, T. und Koyama, Y. (1989): Significance of lateral node dissection for advanced rectal carcinoma at or below the peritoneal reflection, *Dis.Colon Rectum* (Band 32), Nr. 4, Seite 307-315.

[39] Moreira, L. F.; Hizuta, A.; Iwagaki, H.; Tanaka, N. und Orita, K. (1994): Lateral lymph node dissection for rectal carcinoma below the peritoneal reflection, *Br.J.Surg.* (Band 81), Nr. 2, Seite 293-296.

[40] Herfarth, C. und Hohenberger, P. (1989): Lymphadenektomie bei der Primärtherapie colorektaler Carcinome, *Chirurg.* (Band 60), Nr. 3, Seite 139-147.

[41] Jessup, J. M.; McGinnis, L. S.; Steele, G.-D. Jr; Menck, H. R. und Winchester, D. P. (1996): The National Cancer Data Base. Report on colon cancer, *Cancer* (Band 78), Nr. 4, Seite 918-926.

[42] Redmond, O. M.; Stack, J. P.; O'Connor, N. G.; Carney, D. N.; Dervan, P. A.; Hurson, B. J. und Ennis, J. T. (1992): ³¹P MRS as an early prognostic indicator of patient response to chemotherapy, *Magn Reson.Med.* (Band 25), Nr. 1, Seite 30-44.

[43] Tagliacozzo, S. und Tocchi, A. (1997): Extended mesenteric excision in right hemicolectomy for carcinoma of the colon, *Int.J.Colorectal Dis.* (Band 12), Nr. 5, Seite 272-275.

[44] Uyama, I.; Ogiwara, H.; Takahara, T.; Kikuchi, K.; Iida, S. und Kitajima, M. (1996): Extended lymphadenectomy including lymph nodes along the superior mesenteric artery for right colon cancer, *J.Surg.Oncol.* (Band 63), Nr. 1, Seite 63-64.

[45] Sargent, D. J.; Goldberg, R. M.; Jacobson, S. D.; Macdonald, J. S.; Labianca, R.; Haller, D. G.; Shepherd, L. E.; Seitz, J. F. und Francini, G. (2001): A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients, *N.Engl.J.Med.* (Band 345), Nr. 15, Seite 1091-1097.

[46] Merkel, S.; Wein, A.; Gunther, K.; Papadopoulos, T.; Hohenberger, W. und Hermanek, P. (2001): High-risk groups of patients with Stage II colon carcinoma, *Cancer* (Band 92), Nr. 6, Seite 1435-1443.

[47] Steele, G.-D. Jr; Winchester, D. P. und Menck, H. R. (1994): The National Cancer Data Base. A mechanism for assessment of patient care, *Cancer* (Band 73), Nr. 2, Seite 499-504.

[48] Hermanek, P. (1996): Will-Rogers-Phänomen--Fakt oder Fiktion? [The Will Roger's phenomenon--fact or fiction?], *Chirurg* (Band 67), Nr. 8, Seite 769-770.

[49] Hida, J.; Mori, N.; Kubo, R.; Matsuda, T.; Morikawa, E.; Kitaoka, M.; Sindoh, K. und Yasutomi, M. (1994): Metastases from carcinoma of the colon and rectum detected in small lymph nodes by the clearing method, *J.Am.Coll.Surg.* (Band 178), Nr. 3, Seite 223-228.

[50] Davidson, B. R.; Sams, V. R.; Styles, J.; Deane, C. und Boulos, P. B. (1990): Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma, *Cancer* (Band 65), Nr. 4, Seite 967-970.

[51] Jeffers, M. D.; O'Dowd, G. M.; Mulcahy, H.; Stagg, M.; O'Donoghue, D. P. und Toner, M. (1994): The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma, *J.Pathol.* (Band 172), Nr. 2, Seite 183-187.

[52] Isaka, N.; Nozue, M.; Doy, M. und Fukao, K. (1999): Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes' B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2, *Clin.Cancer Res.* (Band 5), Nr. 8, Seite 2065-2068.

[53] Liefers, G. J.; Cleton-Jansen, A. M.; van de Velde, C. J.; Hermans, J.; van Krieken, J. H.;

Cornelisse, C. J. und Tollenaar, R. A. (1998): Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer, *N.Engl.J.Med.* (Band 339), Nr. 4, Seite 223-228.

[54] Sasaki, M.; Watanabe, H.; Jass, J. R.; Ajioka, Y.; Kobayashi, M.; Matsuda, K. und Hatakeyama, K. (1997): Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in "node-negative" colorectal cancer, *J.Gastroenterol.* (Band 32), Nr. 6, Seite 758-764.

[55] Monig, S. P.; Baldus, S. E.; Zirbes, T. K.; Schroder, W.; Lindemann, D. G.; Dienes, H. P. und Holscher, A. H. (1999): Lymph node size and metastatic infiltration in colon cancer, *Ann.Surg.Oncol.* (Band 6), Nr. 6, Seite 579-581.

[56] Suzuka, I.; Shiota, K.; Yamane, M.; Nishihara, M.; Nakagawa, J. und Shimizu, N. (1998): Intra-operative detection of lymph node involvement in carcinoma of the colon, *Hepatogastroenterology* (Band 45), Nr. 24, Seite 2127-2131.

[57] Goldenberg, D. M.; Deland, F. H. und Kim, E. E. (1978): Use of Radiolabeled Antibodies to CEA Antigene for the Localization and Treatment of Diverse Cancer by External Photoscanning, *New Engl J Med* (Band 298), Seite 1384 -1388.

[58] Eitken, D. R.; Hinkle, G. H. und Thurston, M. O. (1984): A Gamma-detecting probe for radioimmunodetection of CEA-reducing tumors, *Dis.Colon Rectum* (Band 27), Seite 279-282.

[59] Haddad, R.; Avital, S.; Troitsa, A.; Chen, J.; Baratz, M.; Brazovsky, E.; Gitstein, G.; Kashtan, H.; Skornick, Y. und Schneebaum, S. (2001): Benefits of radioimmunoguided surgery for pelvic recurrence, *Eur.J.Surg.Oncol.* (Band 27), Nr. 3, Seite 298-301.

[60] Avital, S.; Haddad, R.; Troitsa, A.; Kashtan, H.; Brazovsky, E.; Gitstein, G.; Skornick, Y. und Schneebaum, S. (2000): Radioimmunoguided surgery for recurrent colorectal cancer manifested by isolated CEA elevation, *Cancer* (Band 89), Nr. 8, Seite 1692-1698.

[61] Schneebaum, S.; Arnold, M. W. ; Houchens, D. P.; Greenson, J. K.; Cote, R. J.; Hitchcock, C. L.; Young, D. C.; Mojzisek, C. M. und Martin, E. W. (1995): The significance of intraoperative periportal lymph node metastasis identification in patients with colorectal carcinoma, *Cancer* (Band 75), Nr. 12, Seite 2809-2817.

[62] Cote, R. J.; Houchens, D. P.; Hitchcock, C. L.; Saad, A. D.; Nines, R. G.; Greenson, J. K.; Schneebaum, S.; Arnold, M. W. und Martin, E. W. (1996): Intraoperative detection of occult colon cancer micrometastases using 125 I-radiolabeled monoclonal antibody CC49, *Cancer* (Band 77), Nr. 4, Seite 613-620.

[63] Veronesi, U.; Galimberti, V.; Zurrida, S.; Pigatto, F.; Veronesi, P.; Robertson, C.; Paganelli, G.; Sciascia, V. und Viale, G. (2001): Sentinel lymph node biopsy as an indicator for axillary dissection in early breast cancer, *Eur.J.Cancer* (Band 37), Nr. 4, Seite 454-458.

[64] Giuliano, A. E. (2001): Current status of sentinel lymphadenectomy in breast cancer, *Ann.Surg.Oncol.* (Band 8), Nr. 9 Suppl, Seite 52S-55S.

[65] Statius-Muller, M. G.; Borgstein, P. J.; Pijpers, R.; van Leeuwen, P. A.; van Diest, P. J.; Gupta, A. und Meijer, S. (2000): Reliability of the sentinel node procedure in melanoma patients: analysis of failures after long-term follow-up, *Ann.Surg.Oncol.* (Band 7), Nr. 6, Seite 461-468.

[66] Torrença, H.; Rahusen, F. D.; Meijer, S.; Borgstein, P. J. und van Diest, P. J. (2001): Sentinel node investigation in breast cancer: detailed analysis of the yield from step sectioning and immunohistochemistry, *J.Clin.Pathol.* (Band 54), Nr. 7, Seite 550-552.

[67] Viale, G.; Maiorano, E.; Mazzarol, G.; Zurrida, S.; Galimberti, V.; Luini, A.; Renne, G.; Pruneri, G.; Maisonneuve, P. und Veronesi, U. (2001): Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma, *Cancer* (Band 92), Nr. 6, Seite 1378-1384.

[68] Torrença, H.; Rahusen, F. D.; Borgstein, P. J.; Meijer, S. und van Diest, P. (2000):

Immunohistochemical detection of lymph-node metastases, *Lancet* (Band 355), Nr. 9198, Seite 144.

[69] Zervos, E. E.; Saha, S.; Hoshaw-Woodard, S.; Wheatley, G. H. und Burak, W.-E. Jr (2001): Localizing the sentinel node outside of the specialty center: success of a lymphatic mapping course in disseminating new technology, *Ann.Surg.Oncol.* (Band 8), Nr. 1, Seite 7-12.

[70] Giuliano, A. E.; Haigh, P. I. ; Brennan, M. B.; Hansen, N. M.; Kelley, M. C.; Ye, W.; Glass, E. C. und Turner, R. R. (2000): Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer, *J.Clin.Oncol.* (Band 18), Nr. 13, Seite 2553-2559.

[71] Saha, S.; Bilchik, A.; Wiese, D.; Espinosa, M.; Badin, J.; Ganatra, B. K.; Desai, D.; Kaushal, S.; Singh, T. und Arora, M. (2001): Ultrastaging of colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique--a multicenter trial, *Ann.Surg.Oncol.* (Band 8), Nr. 9 Suppl, Seite 94S-98S.

[72] Wiese, D. A.; Saha, S.; Badin, J.; Ng, P. S.; Gauthier, J.; Ahsan, A. und Yu, L. (2000): Pathologic evaluation of sentinel lymph nodes in colorectal carcinoma, *Arch.Pathol.Lab Med.* (Band 124), Nr. 12, Seite 1759-1763.

[73] Joosten, J. J.; Strobbe, L. J.; Wauters, C. A.; Pruszczynski, M.; Wobbes, T. und Ruers, T. J. (1999): Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma, *Br.J.Surg.* (Band 86), Nr. 4, Seite 482-486.

[74] Tsioulis, G. J.; Wood, T. F. ; Spirt, M.; Morton, D. L. und Bilchik, A. J. (2002): A novel lymphatic mapping technique to improve localization and staging of early colon cancer during laparoscopic colectomy, *Am.Surg.* (Band 68), Nr. 7, Seite 561-565.

[75] Tsioulis, G. J.; Wood, T. F. ; Morton, D. L. und Bilchik, A. J. (2000): Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes upstage gastrointestinal neoplasms, *Arch.Surg.* (Band 135), Nr. 8, Seite 926-932.

[76] Papazoglou, T. G. (1995): Malignancies and atherosclerotic plaque diagnosis--is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution?, *J.Photochem.Photobiol.B.* (Band 28), Nr. 1, Seite 3-11.

[77] Andersson Engels, S.; Johansson, J.; Svanberg, K. und Svanberg, S. (1991): Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue, *Photochem.Photobiol.* (Band 53), Nr. 6, Seite 807-814.

[78] Bottioli, G.; Croce, A. C.; Locatelli, D.; Marchesini, R.; Pignoli, E.; Tomatis, S.; Cuzzoni, C.; Di Palma, S.; Dalfante, M. und Spinelli, P. (1995): Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive "ex vivo" study, *Lasers.Surg.Med.* (Band 16), Nr. 1, Seite 48-60.

[79] Lam, S.; Hung, J. Y.; Kennedy, S. M.; Leriche, J. C.; Vedal, S.; Nelems, B.; Macaulay, C. E. und Palcic, B. (1992): Detection of dysplasia and carcinoma in situ by ratio fluorometry, *Am.Rev.Respir.Dis.* (Band 146), Nr. 6, Seite 1458-1461.

[80] Richards Kortum, R.; Rava, R. P.; Petras, R. E.; Fitzmaurice, M.; Sivak, M. und Feld, M. S. (1991): Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia, *Photochem.Photobiol.* (Band 53), Nr. 6, Seite 777-786.

[81] Panjehpour, M.; Overholt, B. F.; Schmidhammer, J. L.; Farris, C.; Buckley, P. F. und Vo Dinh, T. (1995): Spectroscopic diagnosis of esophageal cancer: new classification model, improved measurement system, *Gastrointest.Endosc.* (Band 41), Nr. 6, Seite 577-581.

[82] Lam, S.; Kennedy, T.; Unger, M.; Miller, Y. E.; Gelmont, D.; Rusch, V.; Gipe, B.; Howard, D.; Leriche, J. C.; Coldman, A. und Gazdar, A. F. (1998): Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy, *Chest* (Band 113), Nr. 3, Seite 696-702.

[83] Hirsch, F. R.; Franklin, W. A.; Gazdar, A. F. und Bunn, P.-A. Jr (2001): Early detection of lung

cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology, Clin.Cancer Res. (Band 7), Nr. 1, Seite 5-22.

[84] Kurie, J. M.; Lee, J. S.; Morice, R. C.; Walsh, G. L.; Khuri, F. R.; Broxson, A.; Ro, J. Y.; Franklin, W. A.; Yu, R. und Hong, W. K. (1998): Autofluorescence bronchoscopy in the detection of squamous metaplasia and dysplasia in current and former smokers, J.Natl.Cancer Inst. (Band 90), Nr. 13, Seite 991-995.

[85] Gossner, L.; Stolte, M.; Sroka, R.; Rick, K.; May, A.; Hahn, E. G. und Ell, C. (1998): Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid [see comments], Gastroenterology (Band 114), Nr. 3, Seite 448 -455.

[86] Barr, H.; Shepherd, N. A.; Dix, A.; Roberts, D. J.; Tan, W. C. und Krasner, N. (1996): Eradication of high-grade dysplasia in columnar-lined (Barrett's) oesophagus by photodynamic therapy with endogenously generated protoporphyrin IX [see comments], Lancet (Band 348), Nr. 9027, Seite 584-585.

[87] Grant, W. E.; Hopper, C.; MacRobert, A. J.; Speight, P. M. und Bown, S. G. (1993): Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitisation with systemic aminolaevulinic acid , Lancet (Band 342), Nr. 8864, Seite 147-148.

[88] Koenig, F.; Knittel, J. und Stepp, H. (2001): Diagnosing cancer in vivo, Science (Band 292), Nr. 5520, Seite 1401-1403.

[89] Svanberg, K.; af Klinteberg, C.; Nilsson, A.; Wang, I.; Andersson Engels, S. und Svanberg, S. (1998): Laser-based spectroscopic methods in tissue characterization, Ann.N.Y.Acad.Sci. (Band 838), Seite 123-129.

[90] af-Klinteberg, C.; Enejder, A. M.; Wang, I.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, S. und Svanberg, K. (1999): Kinetic fluorescence studies of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in basal cell carcinomas, J.Photochem.Photobiol.B (Band 49), Nr. 2-3, Seite 120-128.

[91] Wang, I.; Clemente, L. P.; Pratas, R. M.; Cardoso, E.; Clemente, M. P.; Montan, S.; Svanberg, S. und Svanberg, K. (1999): Fluorescence diagnostics and kinetic studies in the head and neck region utilizing low-dose delta-aminolevulinic acid sensitization, Cancer Lett. (Band 135), Nr. 1, Seite 11-19.

[92] Kriegmair, M.; Baumgartner, R.; Knuchel, R.; Stepp, H.; Hofstadter, F. und Hofstetter, A. (1996): Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence [see comments], J.Urol. (Band 155), Nr. 1, Seite 105-109.

[93] Jichlinski, P.; Forrer, M.; Mizeret, J.; Glanzmann, T.; Braichotte, D.; Wagnieres, G.; Zimmer, G.; Guillou, L.; Schmidlin, F.; Graber, P.; van den Bergh, H. und Leisinger, H. J. (1997): Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light- induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results, Lasers.Surg.Med. (Band 20), Nr. 4, Seite 402-408.

[94] Messmann, H.; Knuchel, R.; Endlicher, E.; Hauser, T.; Szeimies, R. M.; Kullmann, F.; Baumler, W. und Scholmerich, J. (1998): [Photodynamic diagnosis of gastrointestinal precancerous lesions after sensitization with 5-aminolevulinic acid. A pilot study] Photodynamische Diagnostik gastrointestinaler Präkanzerosen nach Sensibilisierung mit 5-Aminolavulinsäure. Eine Pilotstudie, Dtsch.Med.Wochenschr. (Band 123), Nr. 17, Seite 515-521.

[95] Ebert, B.; Nolte, D.; Rinneberg, H.; Moesta, K. T.; Nowack, C. und Schlag, P. M. (1995): Characteristic porphyrin-like autofluorescence in primary colon tumours and lymph nodes, SPIE (Band 2627), Seite 57-67.

[96] Policard, A. (1924): Etudes sur les aspects offerts par les tumeurs experimentales examinees a la lumiere de woods, CR Soc Biol (Band 91), Seite 1423-1425.

[97] Ghadially, F. N. und Neish, W. J. P. (1960): Porphyrin fluorescence of experimentally produced

squamous cell carcinoma, *Nature* (Band 188), Seite 1124.

[98] Harris, D. M. und Werkhaven, J. (1987): Endogenous porphyrin fluorescence in tumors, *Lasers.Surg.Med.* (Band 7), Nr. 6, Seite 467-472.

[99] Cothren, R. M.; Richards Kortum, R.; Sivak, M. V., Jr.; Fitzmaurice, M.; Rava, R. P.; Boyce, G. A.; Doxtader, M.; Blackman, R.; Ivanc, T. B.; Hayes, G. B. und et al (1990): Gastrointestinal tissue diagnosis by laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy, *Gastrointest.Endosc.* (Band 36), Nr. 2, Seite 105-111.

[100] Vo Dinh, T.; Panjehpour, M. und Overholt, B. F. (1998): Laser-induced fluorescence for esophageal cancer and dysplasia diagnosis, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 838), Seite 116-122.

[101] Panjehpour, M.; Overholt, B. F.; Vo Dinh, T.; Haggitt, R. C.; Edwards, D. H. und Buckley, F. P-3rd (1996): Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus [see comments], *Gastroenterology* (Band 111), Nr. 1, Seite 93-101.

[102] Pollack, M. A.; Taylor, A. und William, R. J. (1942): Vitamins in cancerous tissues I. riboflavins, *Cancer Res.* (Band 2), Seite 739-743.

[103] Lohmann, W.; Schill, W. B.; Bucher, D.; Peters, T.; Nilles, M.; Schulz, A. und Bohle, R. (1994): Elastosis and cancer, *Z.Naturforsch.C.* (Band 49), Nr. 3-4, Seite 223-229.

[104] Bellnier, D. A.; Greco, W. R.; Parsons, J. C.; Oseroff, A. R.; Kuebler, A. und Dougherty, T. J. (1997): An assay for the quantitation of Photofrin in tissues and fluids, *Photochem.Photobiol.* (Band 66), Nr. 2, Seite 237-244.

[105] Van Hillegersberg, R.; Van den Berg, J. W.; Kort, W. J.; Terpstra, O. T. und Wilson, J. H. (1992): Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats, *Gastroenterology* (Band 103), Nr. 2, Seite 647-651.

[106] Schoenfeld, N.; Epstein, O.; Lahav, M.; Mamet, R.; Shaklai, M. und Atsmon, A. (1988): The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders, *Cancer Lett.* (Band 43), Nr. 1-2, Seite 43-48.

[107] Smith, A. (1987): Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins. Role of porphyrin-protein interactions, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 514), Seite 309-322.

[108] el Sharabasy, M. M.; el Waseef, A. M.; Hafez, M. M. und Salim, S. A. (1992): Porphyrin metabolism in some malignant diseases, *Br.J.Cancer* (Band 65), Nr. 3, Seite 409-412.

[109] Kondo, M.; Hirota, N.; Takaoka, T. und Kajiwara, M. (1993): Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell lines of rat, *Cell Biol.Toxicol.* (Band 9), Nr. 1, Seite 95-105.

[110] Dailey, H. A. und Smith, A. (1984): Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase, *Biochem.J.* (Band 223), Nr. 2, Seite 441-445.

[111] Rimington, C. und Riley, P. A. (1993): The biochemical approach to cancer therapy: a short essay, *Int.J.Biochem.* (Band 25), Nr. 10, Seite 1385-1393.

[112] Ferreira, G. C.; Franco, R.; Lloyd, S. G.; Moura, I.; Moura, J. J. und Huynh, B. H. (1995): Structure and function of ferrochelatase, *J.Bioenerg.Biomembr.* (Band 27), Nr. 2, Seite 221-229.

[113] Rufenacht, U. B.; Gouya, L.; Schneider-Yin, X.; Puy, H.; Schafer, B. W.; Aquaron, R.; Nordmann, Y.; Minder, E. I. und Deybach, J. C. (1998): Systematic analysis of molecular defects in the ferrochelatase gene from patients with erythropoietic protoporphyria, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 62), Nr. 6, Seite 1341-1352.

[114] Hua, Z.; Gibson, S. L.; Foster, T. H. und Hilf, R. (1995): Effectiveness of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy in vivo, *Cancer Res.* (Band 55), Nr. 8, Seite 1723-1731.

- [115] Iinuma, S.; Farshi, S. S.; Ortel, B. und Hasan, T. (1994): A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin, *Br.J.Cancer* (Band 70), Nr. 1, Seite 21-28.
- [116] Tan, W. C.; Krasner, N.; O'Toole, P. und Lombard, M. (1997): Enhancement of photodynamic therapy in gastric cancer cells by removal of iron, *Gut* (Band 41), Nr. 1, Seite 14-18.
- [117] Berg, K.; Anholt, H.; Bech, O. und Moan, J. (1996): The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells, *Br.J.Cancer* (Band 74), Nr. 5, Seite 688-697.
- [118] Hinnen, P.; de Rooij, F. W.; van Velthuysen, M. L.; Edixhoven, A.; Van Hillegersberg, R.; Tilanus, H. W.; Wilson, J. H. und Siersema, P. D. (1998): Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus, *Br.J.Cancer* (Band 78), Nr. 5, Seite 679-682.
- [119] Gibson, S. L.; Nguyen, M. L.; Havens, J. J.; Barbarin, A. und Hilf, R. (1999): Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro, *Biochem.Biophys.Res Commun.* (Band 265), Nr. 2, Seite 315-321.
- [120] Price, P. und Jones, T. (1995): Can positron emission tomography (PET) be used to detect subclinical response to cancer therapy? The EC PET Oncology Concerted Action and the EORTC PET Study Group, *Eur.J.Cancer* (Band 31A), Nr. 12, Seite 1924-1927.
- [121] Svanberg, K.; Wang, I.; Colleen, S.; Idvall, I.; Ingvar, C.; Rydell, R.; Jocham, D.; Diddens, H.; Bown, S.; Gregory, G.; Montan, S.; Andersson Engels, S. und Svanberg, S. (1998): Clinical multi-colour fluorescence imaging of malignant tumours-- initial experience, *Acta Radiol.* (Band 39), Nr. 1, Seite 2-9.
- [122] Taketani, S.; Inazawa, J.; Nakahashi, Y.; Abe, T. und Tokunaga, R. (1992): Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18, *Eur.J.Biochem.* (Band 205), Nr. 1, Seite 217-222.
- [123] Al Karadaghi, S.; Hansson, M.; Nikonov, S.; Jonsson, B. und Hederstedt, L. (1997): Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis, *Structure.* (Band 5), Nr. 11, Seite 1501-1510.
- [124] Taketani, S. und Fujita, H. (1995): The ferrochelatase gene structure and molecular defects associated with erythropoietic protoporphyria, *J.Bioenerg.Biomembr.* (Band 27), Nr. 2, Seite 231-238.
- [125] Sassa, S. und Kappas, A. (1981): Genetic, metabolic, and biochemical aspects of the porphyrias, *Adv.Hum.Genet.* (Band 11) 121-231-231.
- [126] Kennedy, J. C.; Pottier, R. H. und Pross, D. C. (1990): Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J.Photochem.Photobiol.B* (Band 6), Nr. 1-2, Seite 143-148.
- [127] Bhasin, G.; Kausar, H. und Athar, M. (1999): Ferrochelatase, a novel target for photodynamic therapy of cancer, *Oncol.Rep.* (Band 6), Nr. 6, Seite 1439-1442.
- [128] Hinnen, P.; de Rooij, F. W.; Terlouw, E. M.; Edixhoven, A.; van Dekken, H.; Van Hillegersberg, R.; Tilanus, H. W.; Wilson, J. H. und Siersema, P. D. (2000): Porphyrin biosynthesis in human Barrett's oesophagus and adenocarcinoma after ingestion of 5-aminolaevulinic acid, *Br.J.Cancer* (Band 83), Nr. 4, Seite 539-543.
- [129] Krieg, R. C.; Fickweiler, S.; Wolfbeis, O. S. und Knuechel, R. (2000): Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro, *Photochem.Photobiol.* (Band 72), Nr. 2, Seite 226-233.
- [130] Taketani, S.; Adachi, Y. und Nakahashi, Y. (2000): Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels, *Eur.J.Biochem.* (Band 267), Nr. 15, Seite 4685-4692.

- [131] Marks, G. S.; Mackie, J. E.; McCluskey, S. A. und Riddick, D. S. (1989): Regulation of heme biosynthesis in chick embryo liver cells, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 271), Seite 123-133.
- [132] Noriega, G. O.; Ossola, J. O.; Tomaro, M. L. und Batlle, A. M. (2000): Effect of acetaminophen on heme metabolism in rat liver, *Int.J.Biochem.Cell Biol.* (Band 32), Nr. 9, Seite 983-991.
- [133] Immenschuh, S. und Ramadori, G. (2000): Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target, *Biochem.Pharmacol.* (Band 60), Nr. 8, Seite 1121-1128.
- [134] Ishizaka, N. und Griendling, K. K. (1997): Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells, *Hypertension* (Band 29), Nr. 3, Seite 790-795.
- [135] Rau, B.; Wust, P.; Hohenberger, P.; Loffel, J.; Hunerbein, M.; Below, C.; Gellermann, J.; Speidel, A.; Vogl, T.; Riess, H.; Felix, R. und Schlag, P. M. (1998): Preoperative hyperthermia combined with radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: a phase II clinical trial, *Ann.Surg.* (Band 227), Nr. 3, Seite 380-389.
- [136] Union internationale contre le Cancer (UICC) (1992): TNM Classification of Malignant Tumours, 4. , revised. Auflage , Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- [137] Hohenberger, P.; Schlag, P.; Kretzschmar, U. und Herfarth, C. (1991): Regional mesenteric recurrence of colorectal cancer after anterior resection or left hemicolectomy: inadequate primary resection demonstrated by angiography of the remaining arterial supply, *Int.J.Colorectal Dis.* (Band 6), Nr. 1, Seite 17-23.
- [138] Rouffet, F.; Hay, J. M.; Vacher, B.; Fingerhut, A.; Elhadad, A.; Flamant, Y.; Mathon, C. und Gainant, A. (1994): Curative resection for left colonic carcinoma: hemicolectomy vs. segmental colectomy. A prospective, controlled, multicenter trial. French Association for Surgical Research, *Dis.Colon Rectum* (Band 37), Nr. 7, Seite 651-659.
- [139] Fein, A. P; Lanascha, S.; Gannon, M. P.; Cline, C. P und James, R (1995): Laparoscopic Colon Surgery: report of a Serious, *Am Surg* (Band 61), Seite 412-416.
- [140] Van Yi, T. M.; Kattay, R. P. und Henri, L. G (1994): Laparoscopically Assisted Colon Resections Compare Favourably with Open Technique, *Surg Laparosc Endosc* (Band 4), Seite 25-31.
- [141] Gray, D.; Lee, H.; Schlinkert, R. und Beart, R. W. (1994): Addicracy of Lymphadenectomy in Laparoscopic Assisted Colectomy for Colorectal Cancer: A Preliminary Report, *J Surg Oncol* (Band 57), Seite 8-10.
- [142] Hida, J.; Yasutomi, M.; Fujimoto, K.; Maruyama, T.; Okuno, K. und Shindo, K. (1997): Does lateral lymph node dissection improve survival in rectal carcinoma? Examination of node metastases by the clearing method, *J.Am.Coll.Surg.* (Band 184), Nr. 5, Seite 475-480.
- [143] Ueno, H.; Mochizuki, H.; Hashiguchi, Y. und Hase, K. (2001): Prognostic determinants of patients with lateral nodal involvement by rectal cancer, *Ann.Surg.* (Band 234), Nr. 2, Seite 190-197.
- [144] Moriya, Y.; Sugihara, K.; Akasu, T. und Fujita, S. (1997): Importance of extended lymphadenectomy with lateral node dissection for advanced lower rectal cancer, *World J.Surg.* (Band 21), Nr. 7, Seite 728-732.
- [145] Heald, R. J.; Moran, B. J.; Ryall, R. D.; Sexton, R. und MacFarlane, J. K. (1998): Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997, *Arch.Surg.* (Band 133), Nr. 8, Seite 894-899.
- [146] Ike, H.; Oki, S.; Masui, H.; Yamaguchi, S. und , Shimada H. (1996): Male Sexual Function after Autonomic Nerve Preserving Operation for Rectal Cancer, *Dis.Colon Rectum* (Band 39), Nr. 10, Seite 1140-1145.
- [147] Carlsen, E.; Schlichting, E. ; Guldvog, I.; Johnson, E. und Heald, R. J. (1998): Effect of the

introduction of total mesorectal excision for the treatment of rectal cancer, Br.J.Surg. (Band 85), Nr. 4, Seite 526-529.

[148] Herfarth, C. und Runkel, N. (1994): Chirurgische Standards beim primären Colonicarcinom., Chirurg (Band 65), Nr. 6, Seite 514-523.

[149] Lehnert, T.; Schaible, A. und Herfarth, C. (1999): Onkologische Prinzipien beim Kolonkarzinom. Diagnostik, Therapie und Nachsorge. [Oncologic principles associated with colon carcinoma. Diagnosis, therapy and follow-up], Chirurg (Band 70), Nr. 4, Seite 499-510.

[150] Clogg; Jamison J.K. und Dobson, J. F. (1909): The Lymphatics of the Colon, Ann Surg (Band 50), Seite 1077-1079.

[151] Hermanek, P.; Mansmann, U.; Staimmer, D. S.; Riedl, S. und Hermanek, P. (2000): The German experience: the surgeon as a prognostic factor in colon and rectal cancer surgery , Surg.Oncol.Clin.N.Am. (Band 9), Nr. 1, Seite 33-49,vi.

[152] Olssen, R. N.; Perencevich, N. P und Malcolm, A. W. (1980): Patterns of Recurrence Following Curative Resection of Adenocarcinoma of the Colon and Rectum, Cancer (Band 45), Seite 2969-2974.

[153] Galandiuk, S.; Kentucky, L. und Wiand, H. S. (1992): Patterns of Recurrence after Curative Resection of Carcinoma of the Colon and Rectum, JAM Coll Surg (Band 174), Nr. 27, Seite 32.

[154] Wixner, S. D und Nogueras, J. J. (1994): Invited Commentary: Extended Lymphadenectomy in Right Colonic Cancer, Eur J Surg (Band 160), Seite 183-184.

[155] Hermanneck; Lehnert, T und Herfarth C. (1996): Grundlagen und Wert der Lymphadenektomie beim kolorektalen Karzinom, Chirurg (Band 67), Seite 889-899.

[156] Kotanagi, H.; Fukuoka, T.; Shibata, Y.; Yoshioka, T.; Aizawa, O.; Saito, Y.; Tur, G. E. und Koyama, K. (1993): The size of regional lymph nodes does not correlate with the presence or absence of metastasis in lymph nodes in rectal cancer, J.Surg.Oncol. (Band 54), Nr. 4, Seite 252-254.

[157] Feinstein, A. R.; Sosin, D. M. und Wells, C. K. (1985): The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer, N.Engl.J.Med. (Band 312), Nr. 25, Seite 1604-1608.

[158] Morschel, M.; Heintz, A.; Dienes, H. P. und Junginger, T. (1996): Lymphknotendisektion, Stadienverschiebung und perioperatives Risiko beim Rectumcarcinom. [Lymph node dissection, stage migration and perioperative risk in rectal carcinoma], Chirurg (Band 67), Nr. 9, Seite 915-920.

[159] Scott, K. W.; Grace, R. H. und Gibbons, P. (1994): Five-year follow-up study of the fat clearance technique in colorectal carcinoma, Dis.Colon Rectum (Band 37), Nr. 2, Seite 126-128.

[160] Koren, R.; Siegal, A.; Klein, B.; Halpern, M.; Kyzer, S.; Veltman, V. und Gal, R. (1997): Lymph node-revealing solution: simple new method for detecting minute lymph nodes in colon carcinoma, Dis.Colon Rectum (Band 40), Nr. 4, Seite 407-410.

[161] Gustersson, B. (1992): Are Micrometastases Clinically Relevant?, Br J of Hosp Med (Band 47), Seite 247-248.

[162] Greenson, J. K.; Isenhardt, C. E.; Rice, R.; Mojzisik, C.; Houchens, D. und Martin, E. W., Jr. (1994): Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival, Cancer (Band 73), Nr. 3, Seite 563-569.

[163] Haboubi, N. Y.; Clark, P.; Kaftan, S. M. und Schofield, P. F. (1992): The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal carcinoma, J.R.Soc.Med. (Band 85), Nr. 7, Seite 386-388.

[164] Chaiken, L.; Rege, S.; Hoh, C.; Choi, Y.; Jabour, B.; Juillard, G.; Hawkins, R. und Parker, R.

(1993): Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation therapy, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* (Band 27), Nr. 2 , Seite 455-464.

[165] Wrightson, W. R.; Wong, S. L.; Edwards, M. J.; Chao, C.; Conrad, A. J.; Albrecht, J.; Viar, V. und McMasters, K. M. (2001): Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of nonsentinel nodes following completion lymphadenectomy for melanoma, *J.Surg.Res.* (Band 98), Nr. 1, Seite 47-51.

[166] Ichikawa, Y.; Ishikawa, T.; Momiyama, N.; Yamaguchi, S.; Masui, H.; Hasegawa, S.; Chishima, T.; Takimoto, A.; Kitamura, H.; Akitaya, T.; Hosokawa, T.; Mitsuhashi, M. und Shimada, H. (1998): Detection of regional lymph node metastases in colon cancer by using RT-PCR for matrix metalloproteinase 7, matrilysin, *Clin.Exp.Metastasis* (Band 16), Nr. 1, Seite 3-8.

[167] Rosenberg, R.; Hoos, A.; Mueller, J. und Nekarda, H. (2000): Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer, *Br.J.Cancer* (Band 83), Nr. 10, Seite 1323-1329.

[168] Doiron, D. R. (1983): Photophysics and instrumentation for porphyrin detection and activation, Doiron, D. R. und Gomer, C. J., *Proceedings of the Clayton Foundation International Symposium on Porphyrin Localization and Treatment of Tumors* , Seite 41-73, Santa Barbara, California.

[169] Profio, A. E.; Balchum, O. J. und Carstens, F. (1986): Digital background subtraction for fluorescence imaging, *Med.Phys.* (Band 13), Nr. 5, Seite 717-721.

[170] Mang, T. S.; McGinnis, C.; Liebow, C.; Nseyo, U. O.; Crean, D. H. und Dougherty, T. J. (1993): Fluorescence detection of tumors. Early diagnosis of microscopic lesions in preclinical studies, *Cancer* (Band 71), Nr. 1, Seite 269-276.

[171] Vo Dinh, T.; Panjehpour, M.; Overholt, B. F.; Farris, C.; Buckley, F. P-3rd und Sneed, R. (1995): In vivo cancer diagnosis of the esophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices, *Lasers.Surg.Med.* (Band 16), Nr. 1, Seite 41-47.

[172] Lam, S.; Palcic, B.; McLean, D.; Hung, J.; Korbelik, M. und Profio, A. E. (1990): Detection of early lung cancer using low dose Photofrin II, *Chest* (Band 97), Nr. 2, Seite 333-337.

[173] Lam, S.; MacAulay, C.; Hung, J.; LeRiche, J.; Profio, A. E. und Palcic, B. (1993): Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* (Band 105), Nr. 6, Seite 1035-1040.

[174] Monnier, P.; Savary, M.; Fontollet, C.; Wagnieres, G.; Chatelain, A.; Cornaz, P.; Depeursigne, C. und Van den Berg, H. (1990): Photodetection and photodynamic therapy of 'early' squamous cell carcinomas of the pharynx, oesophagus and tracheo-bronchial tree, *Lasers Med Sci* (Band 5), Seite 149-169.

[175] Baumgartner, R. und Unsold, E. (1987): High contrast fluorescence imaging using two-wavelength laser excitation and image processing, *J.Photochem.Photobiol.B.* (Band 1), Nr. 1, Seite 130-132.

[176] Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Strauss, L. G.; Schlag, P.; Hohenberger, P.; Mohler, M.; Oberdorfer, F. und van Kaick, G. (1998): Fluorine-18-fluorouracil to predict therapy response in liver metastases from colorectal carcinoma, *J.Nucl.Med.* (Band 39), Nr. 7, Seite 1197 -1202.

[177] Tosi, M. R.; Ricci, R.; Bottura, G. und Tugnoli, V. (2001): In vivo and in vitro nuclear magnetic resonance spectroscopy investigation of an intracranial mass, *Oncol.Rep.* (Band 8), Nr. 6, Seite 1337-1339.

[178] Schlag, P. M.; Amthauer, H.; Stroszczyński, C. und Felix, R. (2001): Einfluss der Positronenemissionstomographie auf die chirurgische Therapieplanung beim colorectalen Rezidivtumor. [Influence of positron emission tomography on surgical therapy planning in recurrent colorectal cancer], *Chirurg* (Band 72), Nr. 9, Seite 995-1002.

- [179] Jagannathan, N. R.; Kumar, M.; Seenu, V.; Coshic, O.; Dwivedi, S. N.; Julka, P. K.; Srivastava, A. und Rath, G. K. (2001): Evaluation of total choline from in-vivo volume localized proton MR spectroscopy and its response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer, *Br.J.Cancer* (Band 84), Nr. 8, Seite 1016-1022.
- [180] Moehler, M.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Gutzler, F.; Raeth, U.; Strauss, L. G. und Stremmel, W. (1998): ¹⁸F-labeled fluorouracil positron emission tomography and the prognoses of colorectal carcinoma patients with metastases to the liver treated with 5-fluorouracil, *Cancer* (Band 83), Nr. 2, Seite 245-253.
- [181] Leach, M. O.; Verrill, M.; Glaholm, J.; Smith, T. A.; Collins, D. J.; Payne, G. S.; Sharp, J. C.; Ronen, S. M.; McCready, V. R.; Powles, T. J. und Smith, I. E. (1998): Measurements of human breast cancer using magnetic resonance spectroscopy: a review of clinical measurements and a report of localized ³¹P measurements of response to treatment, *NMR Biomed.* (Band 11), Nr. 7, Seite 314-340.
- [182] Smith, I. C.; Welch, A. E.; Hutcheon, A. W.; Miller, I. D.; Payne, S.; Chilcott, F.; Waikar, S.; Whitaker, T.; Ah-See, A. K.; Eremin, O.; Heys, S. D.; Gilbert, F. J. und Sharp, P. F. (2000): Positron emission tomography using [(18)F]-fluorodeoxy-D-glucose to predict the pathologic response of breast cancer to primary chemotherapy, *J.Clin.Oncol.* (Band 18), Nr. 8, Seite 1676-1688.
- [183] Schelling, M.; Avril, N.; Nahrig, J.; Kuhn, W.; Romer, W.; Sattler, D.; Werner, M.; Dose, J.; Janicke, F.; Graeff, H. und Schwaiger, M. (2000): Positron emission tomography using [(18)F]Fluorodeoxyglucose for monitoring primary chemotherapy in breast cancer, *J.Clin.Oncol.* (Band 18), Nr. 8, Seite 1689-1695.
- [184] Yang, M.; Baranov, E.; Jiang, P.; Sun, F. X.; Li, X. M.; Li, L.; Hasegawa, S.; Bouvet, M.; Al Tuwaijri, M.; Chishima, T.; Shimada, H.; Moossa, A. R.; Penman, S. und Hoffman, R. M. (2000): Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 97), Nr. 3, Seite 1206-1211.
- [185] Yang, M.; Baranov, E.; Moossa, A. R.; Penman, S. und Hoffman, R. M. (2000): Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 97), Nr. 22, Seite 12278-12282.
- [186] Bauer, T. W. und Spitz, F. R. (1998): Adjuvant and neoadjuvant chemoradiation therapy for primary colorectal cancer, *Surg.Oncol.* (Band 7), Nr. 3-4, Seite 175-181.
- [187] Pahlman, L. (2000): Neoadjuvant and adjuvant radio- and radio-chemotherapy of rectal carcinomas, *Int.J.Colorectal Dis.* (Band 15), Nr. 1, Seite 1-8.
- [188] Bosset, J. F.; Mantion, G.; Lorchel, F.; Magnin, V.; Pelissier, E. P.; Gerard, J. P. und Horiot, J. C. (2000): Adjuvant and neoadjuvant radiation therapy for rectal cancer, *Semin.Oncol.* (Band 27), Nr. 5 Suppl 10, Seite 60-65.
- [189] Read, T. E.; McNevin, M. S.; Gross, E. K.; Whiteford, H. M.; Lewis, J. L.; Ratkin, G.; Picus, J.; Birnbaum, E. H.; Fleshman, J. W.; Kodner, I. J. und Myerson, R. J. (2001): Neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the rectum: tumor response and acute toxicity, *Dis.Colon Rectum* (Band 44), Nr. 4, Seite 513-522.
- [190] Sauer, R.; Fietkau, R.; Wittekind, C.; Martus, P.; Rodel, C.; Hohenberger, W.; Jatzko, G.; Sabitzer, H.; Karstens, J. H.; Becker, H.; Hess, C. und Raab, R. (2001): Adjuvant versus neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. A progress report of a phase-III randomized trial (protocol CAO/ARO/AIO-94), *Strahlenther.Onkol.* (Band 177), Nr. 4, Seite 173-181.
- [191] Rau, B.; Hunerbein, M.; Barth, C.; Wust, P.; Haensch, W.; Riess, H.; Felix, R. und Schlag, P. M. (1999): Accuracy of endorectal ultrasound after preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer, *Surg.Endosc.* (Band 13), Nr. 10, Seite 980-984.
- [192] Schroder, R. J.; Pegios, W.; Hunerbein, M.; Vogl, T. J.; Hidajat, N.; Gellermann, J.; Wust, P.; Rau, B.; Schlag, P. und Felix, R. (1997): Magnetresonanztomographie und Endosonographie beim

praoperativen Staging fortgeschrittener Rektumkarzinome nach Hyperthermoradiochemotherapie. [Magnetic resonance tomography and endosonography in the preoperative staging of advanced rectal carcinomas after hyperthermoradiochemotherapy], *Rofo Fortschr.Geb.Rontgenstr.Neuen Bildgeb.Verfahr.* (Band 166), Nr. 3, Seite 199-205.

[193] Moesta, K. T.; Ebert, B.; Handke, T.; Nolte, D.; Nowak, C.; Haensch, W. E.; Pandey, R. K.; Dougherty, T. J.; Rinneberg, H. und Schlag, P. M. (2001): Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases, *Cancer Res.* (Band 61), Nr. 3, Seite 991-999.

[194] Hunerbein, M. und Schlag, P. M. (1997): Three-dimensional endosonography for staging of rectal cancer, *Ann.Surg.* (Band 225), Nr. 4, Seite 432-438.

[195] Hunerbein, M.; Pegios, W.; Rau, B.; Vogl, T. J.; Felix, R. und Schlag, P. M. (2000): Prospective comparison of endorectal ultrasound, three-dimensional endorectal ultrasound, and endorectal MRI in the preoperative evaluation of rectal tumors. Preliminary results, *Surg.Endosc.* (Band 14), Nr. 11, Seite 1005-1009.

[196] Sachs, L. (1992): *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

[197] Napoleon, B.; Pujol, B.; Berger, F.; Valette, P. J.; Gerard, J. P. und Souquet, J. C. (1991): Accuracy of endosonography in the staging of rectal cancer treated by radiotherapy, *Br.J.Surg.* (Band 78), Nr. 7, Seite 785-788.

[198] Glaser, F.; Kuntz, C.; Schlag, P. und Herfarth, C. (1993): Endorectal ultrasound for control of preoperative radiotherapy of rectal cancer, *Ann.Surg.* (Band 217), Nr. 1, Seite 64-71.

[199] Fleshman, J. W.; Myerson, R. J.; Fry, R. D. und Kodner, I. J. (1992): Accuracy of transrectal ultrasound in predicting pathologic stage of rectal cancer before and after preoperative radiation therapy, *Dis.Colon Rectum* (Band 35), Nr. 9, Seite 823-829.

[200] Hoffmann, Karl Titus; Rau, Beate; Wust, Peter; Stroszczyński, Christian; Hunerbein, Michael; Schneider, Ulrike und Felix, Roland (2002): Restaging of locally advanced carcinoma of the rectum with MR imaging after preoperative radio-chemotherapy plus regional hyperthermia, *Strahlenther.Onkol.* (Band 178), Nr. 7, Seite 386-392.

[201] Grann, A.; Minsky, B. D.; Cohen, A. M.; Saltz, L.; Guillem, J. G.; Paty, P. B.; Kelsen, D. P.; Kemeny, N.; Ilson, D. und Bass-Loeb, J. (1997): Preliminary results of preoperative 5-fluorouracil, low-dose leucovorin, and concurrent radiation therapy for clinically resectable T3 rectal cancer, *Dis.Colon Rectum* (Band 40), Nr. 5, Seite 515- 522.

[202] Valentini, V.; Coco, C.; Cellini, N.; Picciocchi, A.; Genovesi, D.; Mantini, G.; Barbaro, B.; Cogliandolo, S.; Mattana, C.; Ambesi-Impimbato, F.; Tedesco, M. und Cosimelli, M. (1998): Preoperative chemoradiation for extraperitoneal T3 rectal cancer: acute toxicity, tumor response, and sphincter preservation, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* (Band 40), Nr. 5, Seite 1067- 1075.

[203] Wagman, R.; Minsky, B. D.; Cohen, A. M.; Guillem, J. G. und Paty, P. P. (1998): Sphincter preservation in rectal cancer with preoperative radiation therapy and coloanal anastomosis: long term follow-up, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* (Band 42), Nr. 1, Seite 51-57.

[204] Rouanet, P.; Fabre, J. M.; Dubois, J. B.; Dravet, F.; Saint-Aubert, B.; Pradel, J.; Ychou, M.; Solassol, C. und Pujol, H. (1995): Conservative surgery for low rectal carcinoma after high-dose radiation. Functional and oncologic results, *Ann.Surg.* (Band 221), Nr. 1, Seite 67-73.

[205] Hyams, D. M.; Mamounas, E. P.; Petrelli, N.; Rockette, H.; Jones, J.; Wieand, H. S.; Deutsch, M.; Wickerham, L.; Fisher, B. und Wolmark, N. (1997): A clinical trial to evaluate the worth of preoperative multimodality therapy in patients with operable carcinoma of the rectum: a progress report of National Surgical Breast and Bowel Project Protocol R-03, *Dis.Colon Rectum* (Band 40), Nr. 2, Seite 131-139.

[206] Findlay, M.; Young, H.; Cunningham, D.; Iveson, A.; Cronin, B.; Hickish, T.; Pratt, B.; Husband, J.; Flower, M. und Ott, R. (1996): Noninvasive monitoring of tumor metabolism using fluorodeoxyglucose and positron emission tomography in colorectal cancer liver metastases:

correlation with tumor response to fluorouracil, J.Clin.Oncol. (Band 14), Nr. 3, Seite 700-708.

[207] Jansson, T.; Westlin, J. E.; Ahlstrom, H.; Lilja, A.; Langstrom, B. und Bergh, J. (1995): Positron emission tomography studies in patients with locally advanced and/or metastatic breast cancer: a method for early therapy evaluation?, J.Clin.Oncol. (Band 13), Nr. 6, Seite 1470-1477.

[208] Nagata, Y.; Yamamoto, K.; Hiraoka, M.; Abe, M.; Takahashi, M.; Akuta, K.; Nishimura, Y.; Jo, S.; Masunaga, S.; Kubo, S. und et, al (1990): Monitoring liver tumor therapy with [18F]FDG positron emission tomography, J.Comput.Assist.Tomogr. (Band 14), Nr. 3, Seite 370-374.

[209] Strauss, L. G. und Conti, P. S. (1991): The applications of PET in clinical oncology, J.Nucl.Med. (Band 32), Nr. 4, Seite 623-648.

[210] Weber, W. A.; Ott, K.; Becker, K.; Dittler, H. J.; Helmberger, H.; Avril, N. E.; Meisetschlager, G.; Busch, R.; Siewert, J. R.; Schwaiger, M. und Fink, U. (2001): Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging, J.Clin.Oncol. (Band 19), Nr. 12, Seite 3058-3065.

[211] Kettelhack, Christoph; Wickede, Minette; Vogl, Thomas; Schneider, Ulrike und Hohenberger, Peter (2002): ³¹Phosphorus-magnetic resonance spectroscopy to assess histologic tumor response noninvasively after isolated limb perfusion for soft tissue tumors, Cancer (Band 94), Nr. 5, Seite 1557-1564.

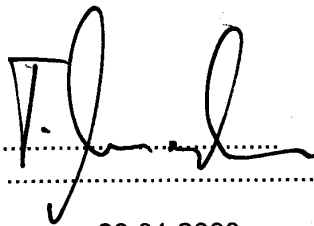
[212] Griffiths, J. R.; Cady, E.; Edwards, R. H.; McCready, V. R.; Wilkie, D. R. und Wiltshaw, E. (1983): ³¹P-NMR studies of a human tumour in situ, Lancet (Band 1), Nr. 8339, Seite 1435-1436.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'V' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Datum 22.01.2003